

**Apolipoprotein AI und HDL₃ inhibieren die Migration humaner Monozyten
durch Induktion des Cholesterinefflux und Regulation von CDC42**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
DIREKTOR: PROF. DR. GERD SCHMITZ

vorgelegt von

Wendy-Anneliese Diederich

Bad Emstal Dez/2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.12.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Schmitz, Medizinische Fakultät Regensburg/

Prof. Dr. Schneuwly, Naturwissenschaftliche Fakultät III

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Schneuwly

Prof. Dr. Schmitz

Prof. Dr. Tschochner

Prof. Dr. Sterner

gewidmet

meinem Sohn Moritz

und

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Lipoproteine und deren Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose

- 1.1.1 Allgemeine Pathophysiologie der Arteriosklerose
- 1.1.2 Endotheliale Dysfunktion und Monozytenrekrutierung
- 1.1.3 Zelluläre Effekte modifizierter LDL
- 1.1.4 Antiatherogene Rolle der HDL in der Atherogenese
 - 1.1.4.1 Reverser Cholesterintransport
 - 1.1.4.2 Weitere protektive Eigenschaften der HDL in der Arteriosklerose

1.2. Die Proteine der Rho-Familie als zentrale Regulatoren der Zytoskelettorganisation

- 1.2.1 Allgemeines Wirkprinzip und Regulation
- 1.2.2 Cell Division Cycle Protein 42 / CDC42-Protein
- 1.2.3 Funktionen von CDC42
 - 1.2.3.1 Rolle von CDC42 in der Zelladhäsion, -migration und Chemotaxis
 - 1.2.3.2 CDC42 und Integrine

1.3. Die Tangier Erkrankung als Modell zur Charakterisierung zellulärer HDL-Effekte

- 1.3.1 Klinik und Pathologie
- 1.3.2 Aufklärung des genetischen Defekts bei der Tangier Erkrankung
 - 1.3.2.1 ABC-Transporter
 - 1.3.2.2 Tangier und ABC1
- 1.3.3 Pathobiochemie und Defekte in der Cholesterin-Homöostase
- 1.3.4 Gestörter Lipidefflux und gestörte Lipoprotein-induzierte Signaltransduktion
- 1.3.5 Tangier und Arteriosklerose

2. Aufgabenstellung

3. Material und Methoden

3.1. Material

- 3.1.1. Geräte und Zubehör
- 3.1.2. Chemikalien
- 3.1.3. Antikörper
- 3.1.4. Oligonukleotide und Primersequenzen
- 3.1.5. Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur
- 3.1.6. Patientengut (Tangier Erkrankung)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturtechniken

- 3.2.1.1. Kultivierung humaner Monozyten
- 3.2.1.2. Kultivierung humaner Tumorzellen
- 3.2.1.3. Kultivierung humaner Hautfibroblasten

3.2.2. Proteinchemische Methoden

3.2.2.1. Präparation von Proteinen aus biologischem Zellmaterial

- 3.2.2.1.1. Gesamtzellextraktion aus humanen Fibroblasten
- 3.2.2.1.2. Gesamtzellextraktion aus humanen Monozyten
- 3.2.2.1.3. Trennung des Gesamtzellextrakts in Zytosol und Membranfraktion
- 3.2.2.1.4. Subfraktionierung eines Zellhomogenats in angereicherte Lysosomale-, Plasma- und intrazelluläre Membranfraktion
- 3.2.2.1.5. Überprüfung der Reinheit in der Subfraktionierung mittels 5'-Nukleotidase

3.2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Lämmli

3.2.2.3. Weitere Proteinchemische Methoden

- 3.2.2.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford
- 3.2.2.3.2. Proteinfärbungen

3.2.3. Immunologische Methoden

3.2.3.1. Western Blotting

3.2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung-Flow-Zytometrische Analyse

3.2.3.2.1. Prinzip eines Durchflußzytometers - Grundlagen

3.2.3.2.2. Direkte Oberflächenfärbung

3.2.3.2.3. Intrazelluläre Färbung

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA nach Chirwing et al.

3.2.4.2. Reverse Transkription von m-RNA

3.2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.4.4. Agarosegelsysteme

3.2.4.4.1. Auftrennung von DNA in nativen Gelen

3.2.4.4.2. Auftrennung von RNA in denaturierenden Gelen

3.2.4.5. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

3.2.4.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.4.6.1. Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA

3.2.4.6.2. Präparation von Insert-DNA ("blunt end"-Klonierung von PCR-Produkten)

3.2.4.6.3. Ligation

3.2.4.6.4. Transformation

3.2.4.6.5. Analyse der Transformanden

3.2.4.7. Fluoreszenzsequenzierung

3.2.4.7.1. Sequenzierreaktion

3.2.4.7.2. Sequenziergel

3.2.4.8. Radioaktive Markierung und Detektion von c-DNA-Sonden

3.2.4.8.1. Radioaktive Markierung von c-DNA-Sonden

3.2.4.8.2. Northern Blotting

3.2.4.8.3. Hybridisierung

3.2.4.8.4. Autoradiographie

3.2.4.9. Sonstige molekularbiologische Methoden

3.2.4.9.1. Isolierung von Plasmid DNA

3.2.4.9.2. Kultivierung von Bakterien (E.coli)

3.2.5. In vitro-Uptake von Antisense-Oligonukleotiden

3.2.5.1. In vitro-Uptake von Antisense-und Random-Oligonukleotiden

3.2.5.2. In vitro-Fluoreszenz-Uptake von Antisense-Oligonukleotiden

3.2.6. Funktionelle Assays

3.2.6.1. Protein Interaktions-Technik, Pull Down-Assay

3.2.6.1.1. Präparation eines GST-Fusionsprotein

3.2.6.1.2. CDC42-Aktivitäts-Assay

3.2.6.2. Spreading-Assay

3.2.6.3. Chemotaxis-Assay

3.2.7. Verschiedenes

3.2.7.1. Präparation von Lipoproteinen

3.2.7.1.1. Präparation einer enzymatisch modifizierten LDL-Fraktion

3.2.7.1.2. Präparation einer AcLDL-Fraktion

3.2.7.2. Northern Blot und Western Blot-Quantifizierungen

3.2.7.2.1. Image Quant

3.2.7.2.2. Lumi Imager

3.2.7.3. Statistik

4. Ergebnisse

4.1. Cholesterinhomöostase und Zellmigration

4.1.1. Ausbreitung oder Zellspreading von Monozyten

4.1.1.1. M-CSF-induziertes Spreading von Kontroll-Monozyten

4.1.1.2. Einfluss von HDL₃ und apo AI auf das M-CSF-induzierte Spreading

4.1.1.3. Effekt von p-Cyclodextrin und enzymatisch modifizierten LDL auf das M-CSF-induzierte Spreading

4.1.2. fMLP-induzierte Chemotaxis von Monozyten

4.2. Mögliche Zielproteine und Effektoren des ABC-1-Pathways

4.2.1. Modulation der für Adhäsion und Differenzierung relevanten Oberflächen-Antigene durch HDL₃, apo AI und E-LDL

4.2.1.1. Effekt von M-CSF auf die Expression der Oberflächen-Antigen

4.2.1.2. Einfluss von HDL₃, apo AI und E-LDL auf die Expression der Oberflächenmoleküle

4.2.2. Expression von CDC42 als Regulator des Zytoskeletts in Monozyten

4.2.2.1. RNA-Expression während der M-CSF-induzierten in vitro-Differenzierung

4.2.2.2. Protein-Expression während der in vitro-Differenzierung

4.2.2.3. CDC42-Proteinexpression in Monozyten nach Agonisten Stimulation

4.2.2.3.1. Regulation der CDC42-Proteinexpression durch HDL₃

4.2.2.3.2. Regulation der CDC42- Proteinexpression durch apo AI

4.2.2.3.3. Regulation der CDC42- Proteinexpression durch p-Cyclodextrin

4.2.2.3.4. Regulation der CDC42- Proteinexpression durch E-LDL

4.2.2.4. Intrazelluläre CDC42-Proteinexpression in Monozyten

4.2.3. Aktivitätsmessung von CDC42, "Pull-Down-Assay"

4.2.4. M-CSF-induziertes Spreading nach CDC42-AS Behandlung

4.2.4.1. In vitro-Uptake der Antisense-Oligonukleotide in Monozyten

4.2.4.2. Einfluss der CDC42-Antisense auf das Zellspreeding

4.3. *Untersuchung zum Spreading- und Adhärenz-Verhalten ABCA 1-defizienter Monozyten*

4.3.1. Einfluss von HDL₃ und apo AI auf das M-CSF-induzierte Spreading von Tangier-Monozyten

4.3.2. Effekt von M-CSF auf die Expression der Oberflächen-Antigene Tangiermonozyten

4.3.3. Einfluss von HDL₃, apo AI und E-LDL auf die Expression der Oberflächen-Antigene in Tangiermonozyten

4.3.4. CDC42-Expression in Tangier-Monozyten

4.3.4.1. M-CSF-induzierte CDC42-Expression

4.3.4.2. Basale Expression am Tag2 der Monozyten-Differenzierung

4.3.4.3. Vergleichende CDC42-Expression während der M-CSF-induzierten Differenzierung zwischen Tangier und Normal in der FACS-Analyse

4.3.5. Regulation der CDC42-Expression durch Ceramid

4.4. *Expression und Regulation von CDC42 und interagierenden Proteinen in humanen Fibroblasten*

4.4.1. Einfluss von HDL₃ und apo AI auf die Expression von CDC42 in Tangier- und Normal-Fibroblasten

4.4.1.1. RNA-Expression von CDC42

4.4.1.2. Proteinexpression von CDC42

4.4.2. Basale Proteinexpression von CDC 42 in Tangier- und Normal-Fibroblasten

4.4.2.1. Basalvergleich der Expression von CDC42

4.4.2.2. Verteilung der CDC42-Expression zwischen Zytosol und Gesamtmembran im Vergleich Tangier-Normal

4.4.2.3. CDC42 in der Subfraktionierung

4.4.3. Expression von IQGAP

4.4.3.1. IQGAP im Basalvergleich zwischen Tangier- und Normalfibroblasten

4.4.3.2. IQGAP in der Subfraktionierung zwischen Tangier- und Normalfibroblasten

4.4.4. Anreicherung von β -COP als spezifischer Marker für die Golgimembran

5. Diskussion

5.1. Einfluss des zellulären Cholesterin-Gehalts auf die Adhärenz, Migration und Chemotaxis mononukleärer Zellen

5.2. Rolle von CDC42 in der Migration monozytärer Zellen

5.2.1. Modulation der CDC42-Expression durch Lipoproteine

5.3. CDC42 und humane Erkrankungen

5.3.1. CDC42 und Tangier-Erkrankung

5.3.2. Expression von CDC42 in Tangier-Monozyten und Fibroblasten

5.3.3. ABCA-1, das Zytoskelett und CDC42

5.3.4. Spreading und Adhärenz von Tangier-Monozyten

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Originalpublikationen

9. Abkürzungen

10. Danksagung

1. Einleitung

1.1. Lipoproteine und deren Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose

1.1.1. Allgemeine Pathophysiologie der Arteriosklerose

Fortgeschrittene arteriosklerotische Läsionen sind morphologisch durch die Akkumulation von Makrophagen, glatten Muskelzellen, Bindegewebskomponenten und Lipiden charakterisiert [Ross (1993); Ross (1999)]. Es handelt sich um einen inflammatorischen Prozeß, der bereits im Jugendalter beginnt und im mittleren Lebensalter im Rahmen von Reparaturmechanismen zum fokalen, strukturellen Umbau von Arterien und schließlich zur Gefäßwandverdickung mit Lumenverengung führt. Ablagerungen von thrombotischem Material auf arteriosklerotischen Läsionen führen zu einer zusätzlichen Beschleunigung der Gefäßwandverdickung [Ross (1993); Ross (1999)]. Nach jahrzehntelanger, asymptomatischer Progression der arteriosklerotischen Veränderungen manifestieren sich schließlich klinische Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Erkrankungen. Die Arteriosklerose ist die bedeutendste Todesursache in den westlichen Industrienationen [Ross (1993)]. Die Entstehung der Arteriosklerose wird als ein multifaktorielles Geschehen angesehen. Durch epidemiologische und experimentelle Untersuchungen sind zahlreiche Risikofaktoren identifiziert worden. Zu den klassischen Risikofaktoren der KHK zählen die Hypertonie, die Hypercholesterinämie und das Zigarettenrauchen [Keil (1990)]. Weitere prädisponierende Faktoren sind Adipositas, der Diabetes mellitus assoziiert mit hohen Triglyceriden, niedrigem HDL und "small-dense" LDL sowie infektiös-toxische Agentien, genetische Faktoren, Hyperfibrinogenämie und erhöhte Lipoprotein (a)-Plasmaspiegel [Bräsen and Niendorf (1997)].

Verschiedene Modelle zur Entstehung der Arteriosklerose sind postuliert worden. Von besonderer Bedeutung ist die sog. „Modified-Response-to-Injury“-Theorie [Ross (1986; 1993)], nach der cholesterinreiche Lipoproteine einen Hauptrisikofaktor für die initiale Noxe, die Verletzung der Endothelschicht darstellt. Die Entstehung der arteriosklerotischen Läsion ist demzufolge als Antwortreaktion einer Reihe von spezifischen zellulären und molekularen Prozessen anzusehen [Ross (1995); Ross (1999)], die in die chronisch entzündliche Erkrankung, die die Arteriosklerose darstellt, mündet.

Durch die beschriebenen Risikofaktoren kommt es zu Verletzungen der Endothelschicht der Arterienwand [Consigny (1995)] und schließlich zur Endotheldysfunktion. Dadurch

erhöht sich die Permeabilität des Endothels für Plasmapbestandteile. Als Folge exprimiert die veränderte Endothelzelle Signale, die zur Adhäsion von Monozyten führen. Monozyten reagieren ihrerseits durch Expression von Adhäsionsmolekülen mit einer verstärkten Adhäsion an das Endothel, was schließlich zu deren Transmigration in den Subendothelialraum führt [Dunon et al. (1996)]. In der Intima differenzieren Monozyten zu aktivierten Makrophagen oder zu phagozytisch aktiven Scavengerzellen. Während dieser Differenzierung sezernieren sie Zytokine, die chemotaktische Reize für die glatten Muskelzellen in der Media der Gefäßwand darstellen sowie Wachstumsfaktoren, die die eingewanderten glatten Muskelzellen zur Proliferation stimulieren [Murakami et al. (1996); Van der Wal et al. (1992)]. Interessanterweise können auch Komplementkomponenten in der Gefäßwand nachgewiesen werden, was auf immunologische Prozesse bei der Entstehung von Gefäßwandläsionen hinweist [Bhakdi et al. (1998)].

Die eingewanderten, aktivierten Monozyten und Makrophagen sezernieren darüber hinaus hydrolytische Enzyme, die Lipoproteine, vor allem das LDL, in ein atherogenes Molekül verwandeln [Brown and Goldstein (1983); Navab et al. (1995)]. Die phagozytisch aktiven Makrophagen, die eine hohe Expressionsdichte von Fc- und Scavengerrezeptoren aufweisen, nehmen die chemisch modifizierten LDL auf und lagern diese im Zytoplasma in Vakuolen ab [Bhakdi et al. (1998)]. Die Aufnahme dieser LDL induziert in den Zellen die Bildung des Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) [Klouché et al. (1998), Liao et al. (1995)], was zur weiteren Migration von Monozyten führt. Die Progression der Arteriosklerose verläuft nun in folgender Sequenz: der Akkumulation von Monozyten, der anschließenden Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Formation fibrösen Gewebes, und schließlich zu der Gefäßwandverdickung und makroskopisch sichtbaren Manifestation der Arteriosklerose. Ein weiteres Modell zur Entstehung der Arteriosklerose ist die „Response-to-Retention-Hypothese“, nach der atherogene Lipoproteine in der Arterienwand an Orten, wo später das Atherom entsteht, akkumulieren. Das impliziert, dass die Retention von Lipoproteinen, nicht die endotheliale Permeabilität für dieselben das Schlüsselereignis in der Entstehung der Arteriosklerose darstellt [Schwenke and St Clair (1993)]. Nachfolgende Studien in verschiedenen Tiermodellen zeigten, dass entweder vermehrte oder verringerte Konzentrationen von Lipoproteinen in potentiellen arteriosklerotischen Bereichen zu finden waren. Eine gesteigerte Retention von ApoB-reichen atherogenen Lipoproteinen konnte in diesen präläsionalen Bereichen der Arterienwand nachgewiesen werden [Nielsen et al. (1992), Falcone et al. (1984)].

Desweiteren wird angenommen, dass sich Läsionen bei ausreichend hohen Plasmalipoprotein-Konzentrationen an Stellen entwickeln, wo sich Gefäße verzweigen oder in den Pulmonararterien [Ishibashi et al. (1994)].

Der zweite Prozeß, der in der Entstehung der Arteriosklerose als zentral angesehen wird, ist die Lipoproteinoxidation [Steinberg and Witztum (2002), Witztum and Steinberg (2001)]. Nach der Retention der Lipoproteine mit Proteoglykanen, erfährt LDL verschiedene Modifikationen mit hinreichenden pathophysiologischen Konsequenzen. Proteoglykan-gebundenens LDL formt *in vitro* Aggregate und vesikuläre Strukturen, die denen *in vivo* gleichen [Hurt-Camejo et al. (1997), Tabas et al. (1993)]. LDL-Proteoglykane zeigen eine hohe Anfälligkeit gegenüber Oxidation unter Serum- und Albumin-freien experimentellen Bedingungen [Hurt-Camejo et al. (1992)]. Schon minimal oxidiertes LDL induziert in Endothel- und glatten Muskelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und weiteren Proteinen, die zur Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten beitragen, es kommt zur Progression der Arteriosklerose [Cushing et al. (1988)].

1.1.2. Endotheliale Dysfunktion und Monozytenrekrutierung

Unter physiologischen Bedingungen trägt die Gefäßwand durch adaptive Veränderung ihres funktionellen Status zur Gefäßhomöostase bei. Dies geschieht durch kontinuierliche Adaptation der Gefäßwand an lokale Stimuli. Die biologische Funktion des Endothels beinhaltet die aktive Aufrechterhaltung der Haemostase (Kontrolle der Plättchenfunktion, der Koagulation und des fibrinolytischen Systems), die Kontrolle von Blutdruck, endothelialer Permeabilität und die Steuerung des glatten Muskelzell-(SMC)-Wachstums in der Media [de Caterina (2000)]. Spezifische Stimuli können die antithrombotische Eigenschaft, den Blutdruck, die Permeabilität für Plasmalipoproteine, die Adhärenz der Leukozyten und deren Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verändern [Vadas et al. (1997)]. All diese Veränderungen tragen zur Aktivierung des Endothels bei. Diese Entzündung ist initial gekennzeichnet durch die Bindung von Leukozyten an das Endothel. Die Bindung von Monozyten an eine morphologisch normale Arterienwand wird im Tiermodell bei einer cholesterinreichen Diät oder bei der humanen Arteriosklerose mit erhöhten Plasmalipoprotein-Konzentrationen beobachtet [Cybulsky and Gimbrone (1991)]. Die erhöhte Bindung von Leukozyten an das Endothel wird durch eine Vielzahl von Proteinen vermittelt, die durch Stimuli in ihrer Expressionsdichte verändert werden. Zu diesen Proteinen gehören die Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selectine, die

Chemoattraktants, die Chemokine, in diesem Zusammenhang vor allem das MCP-1 und das IL-8, die Immunglobulinfamilie der interzellulären Adhäsionsproteine ICAM-1-3 und das Gefäß-Adhäsion-Protein VCAM-1. Die Adhäsionsmoleküle sind die Rezeptoren für die Integrin-Liganden auf der Oberfläche der Leukozyten [Beekhuizen and van Furth (1993)]. In Tabelle 1 ist eine Auswahl der Adhäsionsmoleküle, Chemoattraktantien und deren Rezeptoren dokumentiert.

Gene Familie, CD-Nomenklatur	Zelluläre Expression	Rezeptoren
β₂-Integrine		
CD11a/CD18 (LFA-1)	Monozyten, Lymphozyten	ICAM-1,2,3
CD11b/CD18 (Mac-1)	Monozyten	ICAM-1,2,3
CD11c/CD18	Monozyten	ICAM-1,2,3
β₁-Integrine		
CD49d (VLA-4)	Monozyten, Lymphozyten	ICAM-1,2,3
Zytokine		
IL-1	Monozyten, glatte Muskelzellen	IL-1-Rezeptor
TNF	Monozyten, glatte Muskelzellen	TNF-Rezeptor
M-CSF	Endothelium, glatte Muskelzellen	M-CSF-Rezeptor
MCP-1	Endothelium, glatte Muskelzellen	MCP-1-Rezeptor

Tabelle 1: Ausgewählte Adhäsionsmoleküle, Chemoattraktantien und deren Rezeptoren [Imhof and Dunon (1995); M.Timothy et al. (1994)]

Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und die Rekrutierung dieser in die Intima wird über die Expression von VCAM-1 vermittelt [Cybulsky and Gimbrone (1991)]. VCAM-1 wird zu einem frühen Zeitpunkt während der Cholesterin-Fütterung bei Hasen exprimiert und wird als initiales Ereignis für das Erscheinen der Makrophagen in der Intima angesehen [Li et al. (1993)]. Die Induktion der Genexpression von VCAM-1 und der Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, E-Selectine sowie der induzierbaren, löslichen endothelialen Produkte wie z.B. MCP-1, M-CSF, IL-6 und IL-8 vermehrt sich dramatisch als Antwort auf LPS, Zytokine (IL-1 und TNF-α) und andere stressauslösende Faktoren bei oxidativen Prozessen. Die Interaktion der Endotoxine und Zytokine mit ihren

Zelloberflächen-Rezeptoren löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die zur Aktivierung des Endothels führt. Voraussetzung für die Zytokinproduktion und die Expression der Adhäsionsmoleküle ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie die „early response“-Gene c-jun und c-fos und des NF κ B-Systems [Kishimoto et al. (1994)]. Vor allem das NF κ B-System ist für die Induktion der Adhäsionsmolekül-Expression verantwortlich [Collins (1993)]. Das NF κ B-System selbst wird vorwiegend durch oxidativen Streß aktiviert, da Antioxidantien deren Aktivierung inhibieren können. Monozyten sezernieren die Zytokine, die ihrerseits die Aktivierung des Endothels vorantreiben. Auslöser der Endothel-Aktivierung ist die Akkumulation von LDL und deren Derivaten in der Intima [Dart and Chin-Dusting (1999)]. Im Besonderen die oxidativ und enzymatisch veränderten LDL-Spezies, die sich in der Arterienintima in einer antioxidantien-freien Umgebung befinden, sind die stärksten Initiatoren der Endothel-Aktivierung. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Adhärenz von Monozyten an das Endothel und die Produktion von MCP-1 und M-CSF um das Vielfache gesteigert wird nach der Stimulation mit oxLDL und anderen LDL-Derivaten [Berliner et al. (1990); Berliner et al. (1995)]. In einer Studie mit U937-Zellen wurde gezeigt, dass natives LDL nicht in der Lage ist, die dosisabhängige Wirkung von oxLDL auf die Bindung von U937-Zellen an Endothelzellen zu initiieren [Maier et al. (1994); Mayer et al. (1994)].

Neben den proinflammatorischen Stimuli beeinflussen auch antiinflammatorische Faktoren die Endothelaktivierung. In den Blutgefäßen sind die Endothelzellen von den glatten Muskelzellen durch eine Basalmembran getrennt, wobei die Zellen über Lücken, sog. „Gaps“, in Verbindung stehen. Es konnte gezeigt werden [Sato et al. (1989); Antonelli-Orlidge et al. (1990)], dass die beiden Zelltypen im Gefäß eine physiologisch interaktive Einheit bilden. Die Verbindung dieser beiden Zellen als funktionelle Einheit generiert die biologisch aktive Form des Zytokins TGF- β in Blutgefäßen. Dieses Zytokin existiert als inaktiver Precursor und kann durch enzymatische Spaltung (Plasmin) in die aktive Form überführt werden. Die aktive Form des TGF- β kann sowohl die zelluläre Proliferation als auch die Expression von Adhäsionsmolekülen inhibieren. Die Spaltung in die aktive Form findet nur statt, wenn die Endothelzelle mit der glatten Muskelzelle eine funktionelle Einheit bildet. In Form dieser funktionellen Einheit können die beiden Zelltypen den proinflammatorischen Stimuli entgegenwirken. Allerdings findet in der atheromatösen Plaque durch infiltrierende Zellen und Ablagerung von Proteinen und Lipiden eine räumliche Trennung der Endothelzelle und der glatten Muskelzelle statt.

Ab diesem Zeitpunkt ist die Integrität des Endothels bereits gestört und es kommt zur Progression der Arteriosklerose.

Bleibt zu erwähnen, dass HDL einen ähnlich antiinflammatorischen Einfluss auf das Endothel besitzt [Rubba and Mancini (1995)]. Es gilt in diesem Zusammenhang als dauerhaft wirkender Inhibitor, der im Gegensatz zu den Zytokinen bleibend auf die Zelle einwirken kann. Die antiatherogene Rolle der HDL soll im Kp. 1.1.4. ausführlich beschrieben werden.

1.1.3. Zelluläre Effekte modifizierter LDL

Goldstein et al. postulierten [Goldstein and Brown (1977); Goldstein et al. (1979)], dass ein erhöhter LDL-Plasmaspiegel einen wesentlichen Faktor der Arteriosklerose darstellt, weil LDL spontan ins Subendothelium einwandern kann. Dort wird es von den Makrophagen aufgenommen, wobei die übermäßige intrazelluläre Akkumulation des Cholesterins zur Schaumzellbildung führt. Diese Schaumzellen sind Bestandteile der fibrösen Plaque, der aus histologischer Sicht ein typisches Merkmal der fortgeschrittenen Arteriosklerose darstellt. Die zelluläre Aufnahme verschiedener Formen modifizierter Lipide und Lipoproteine verursacht die Transformation der Makrophagen in Schaumzellen.

Es gibt mehrere Hypothesen wie die modifizierten LDL zur Progression der Arteriosklerose beitragen. Die weitverbreitetsten Hypothesen sind die ox-LDL-Hypothese und die E-LDL-Hypothese.

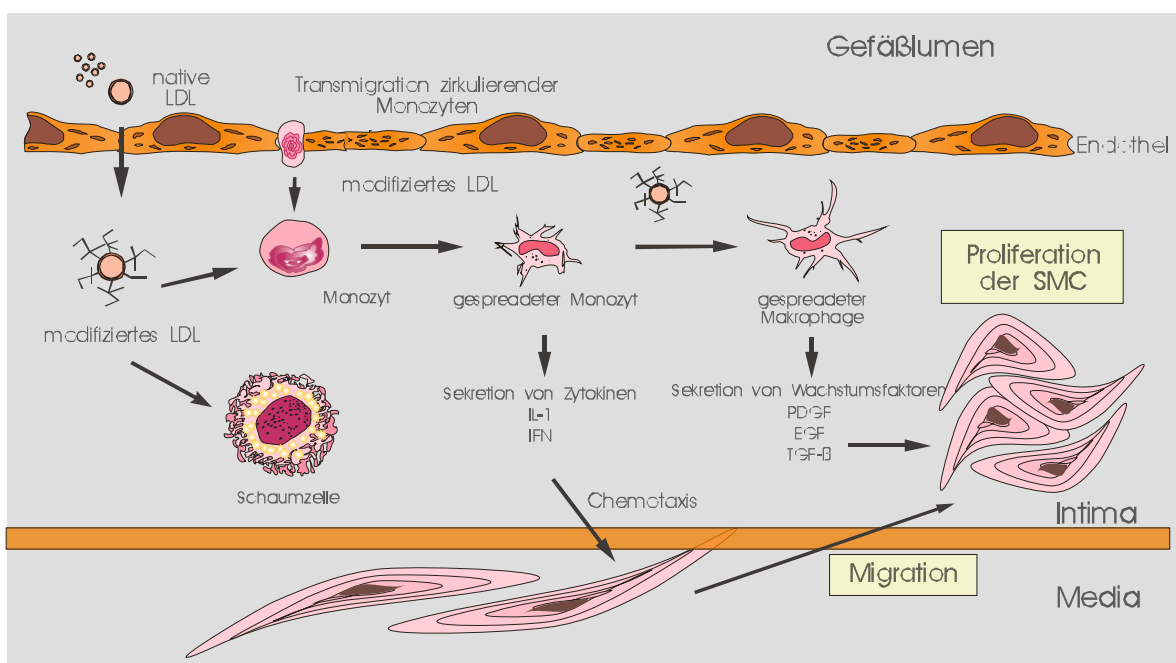


Abb.1: Schematische Darstellung der Entstehung der Arteriosklerose

Die ox-LDL-Hypothese geht davon aus, dass die Oxidation von LDL in der Zirkulation oder im subendothelialen Raum stattfindet und das initiale Schlüsselereignis der Arteriosklerose darstellt [Steinberg (1997)]. *In vitro* hergestelltes ox-LDL hat die erforderlichen proatherogenen Eigenschaften, wie die Induktion der Expression der Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen. Darüber hinaus fördert es die Monozyten-Transmigration in die Intima, wird von sog. Scavenger-Rezeptoren erkannt, internalisiert und verursacht die Schaumzellbildung [Steinberg (1991); Steinberg (1989)]. Außerdem besitzt es toxische Wirkungen auf verschiedene Zellen. Die Scavenger-Rezeptoren stellen neben dem LDL-Rezeptor weitere Rezeptoren dar, die für die Aufnahme der modifizierten LDL verantwortlich sind. Sie sind ausschließlich auf Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems und den Kupfer-Sternzellen exprimiert [Schmitz et al. (1997)] und unterliegen im Gegensatz zum LDL-Rezeptor nicht der Feedback-Regulation durch Cholesterin.

Die Schaumzellbildung ist begleitet mit der Sekretion von Zytokinen, induziert die Expression von MCP-1 und die Produktion von IL-8. Beide besitzen ein chemotaktisches Potential [Cushing et al (1990); Terkelstaub et al. (1994)]. Trotz der überwältigenden Indizien wird ox-LDL nur in geringen Mengen in arteriosklerotischer Plaque gefunden. [Kühn et al. (1997)]. Ac-LDL ist ein *in vitro*-Artefakt und kommt *in vivo* nicht vor. D.h. es fehlen nennenswerte Konzentrationen eines physiologischen Liganden für den Scavenger-Rezeptor in der Plaque. Außerdem fließen subendothelial abgelagerte LDL-Moleküle im Laufe von Tagen und Wochen zusammen und bilden große Lipidkonglomerate. Diese Lipidtröpfchen besitzen einen hohen Anteil an freiem Cholesterin. Ox-LDL hingegen behält die Mikromorphologie des LDL bei und enthält vorwiegend verestertes Cholesterin [Mora et al. (1987); Simionescu et al. (1986)].

Kurz nach der Ablagerung von LDL im Subendothel kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Ablagerung der Komplementfaktoren C3 und C5b-9 [Bhakdi (1998); Torzewski et al. (1997)]. Aus arteriosklerotischem Material konnte ein Lipid isoliert werden, welches freies Cholesterin enthält und die gleiche Morphologie der oben erwähnten Liposomen aufweist. Dieses Lipid kann den alternativen Komplementweg spontan aktivieren. Ox-LDL ist dazu nicht in der Lage. [Bhakdi et al (1995)].

Diese Beobachtungen brachten Bhakdi et al. [Bhakdi (1998); Bhakdi et al. (1998)] dazu, ein alternatives Konzept zur Entstehung der Arteriosklerose zu formulieren. Sie postulieren, dass jedes LDL-Molekül das Potential besitzt, die Komponenten des Immunsystems zu aktivieren. LDL wird außerhalb der Zelle modifiziert, und zwar

enzymatisch (E-LDL) durch inflammatorische Hydrolyse und nicht zwingend oxidativ. Dieses E-LDL (auch opsoniertes LDL) ist in der Lage, sowohl das Komplementsystem als auch Makrophagen zu aktivieren. Bestätigt werden kann diese Hypothese durch folgende experimentelle Beobachtung: durch die Anwesenheit von freiem Cholesterin im E-LDL kann *in vitro* der alternative Komplementweg aktiviert werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass CRP an E-LDL bindet, wodurch die Komplementaktivierung vorangetrieben wird [Torzewski et al. (1998)]. *In vivo* korrelieren diese Befunde mit der Anwesenheit von CRP in allen arteriosklerotischen Läsionen. Zudem kann E-LDL zusammen mit CRP durch einen monoklonalen Antikörper immunhistochemisch in diesen nachgewiesen werden [Torzewski et al. (1998) a/b]. E-LDL wird von den Makrophagen über den Scavenger-Pathway aufgenommen, was zur Schaumzellformation führt. Die E-LDL-Inkubation von Makrophagen induziert die mRNA von MCP-1, so dass es zu einer massiven Sekretion dieses Chemoattraktans kommt [Klouché et al. (1998)]. Wie ox-LDL kann E-LDL die Adhäsion von Monozyten und die Transmigration durch Endothel-Monolayer verstärken [Klouché (1999)].

In der E-LDL-Hypothese stellt ein erhöhter LDL-Plasmaspiegel den Hauptrisikofaktor der Arteriosklerose dar, dabei nehmen Oxidationsvorgänge eine Nebenrolle ein. LDL erreicht hauptsächlich in nativer Form das Subendothel, wo es von der Cholesterinesterase umgebaut und von Makrophagen aufgenommen wird. Bei Überladung der Schaumzellen kommt es zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (IL-6), Makrophagen gehen in Apoptose, Lipide werden wieder frei gesetzt und es kommt zur Komplementaktivierung. So geht der Prozeß in eine chronische Entzündung über.

1.1.4. Antiatherogene Rolle der High Density Lipoproteine in der Atherogenese

Da nun, wie bereits beschrieben eine Reihe von gefäßwandschädigenden Faktoren bekannt sind, müssen auch protektive Faktoren postuliert werden. Durch zahlreiche epidemiologische und klinische Studien konnte eine inverse Korrelation zwischen der HDL-Konzentration im Plasma und dem KHK-Risiko festgestellt werden [Gordon and Johnson (1977); Kashyap (1998); Kwiterovich P.O. (1998)]. Da die Speicherung von Cholesterinestern ein auffälliges Merkmal früher atheromatöser Läsionen ist, wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen Cholesterinaufnahme und -abgabe in diesen Läsionen besteht [Brown and Goldstein (1986)]. Wie oben beschrieben, spielt die Anreicherung von Cholesterinestern in den Makrophagen, welche zur Schaumzelle differenzieren, eine entscheidende Rolle bei der Progression der Plaque. HDL kann

Cholesterin aus der Zelle mobilisieren und spielt damit eine wichtige Rolle in der Cholesterinhomöostase. Die Mobilisation von Cholesterin steht am Anfang eines Prozesses, der als reverser Cholesterintransport bezeichnet wird [Tall (1990); Rothblat (1999)]. Neben dieser Funktion werden dem HDL aber auch antiinflammatorische und immunregulatorische Eigenschaften zugesprochen.

1.1.4.1. Reverser Cholesterintransport

Die Bereitstellung und der Transport von Cholesterin ist für die tierische Zelle u.a. für die Membranbiogenese, für das Zellwachstum, für die Synthese von Lipoproteinen und Gallensäuren (Hepatozyten) existentiell [Myant (1990); Oram (1990)].

Cholesterin kann entweder von der Zelle neu gebildet oder über die Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Bei der Synthese beschreitet das Cholesterin einen intrazellulären vesikulären Pathway [Marsh and McMahon (1999)]. Cholesterin wird synthetisiert am ER und schnell zur PM transloziert, ein Prozeß an dem das Oxysterol Binding Protein beteiligt ist (OSBP) [Lagace et al. (1997)]. Dieser Transport kann Golgi unabhängig sein und von Blanchette-Mackie und Scow wurde ein lateraler Transport über ein Membrankontinuum postuliert [Blanchette-Mackie und Scow (1983)]. Die Synthese von Cholesterin wird durch einen Rückkopplungsmechanismus von der β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA) kontrolliert [Brown et al. (1973), [Goldstein and Brown (1990)].

Die Internalisierung von exogenem Cholesterin verläuft über den LDL-Rezeptor (LDLR) und das LDLR-related Protein, die an der PM in den Coated Pits lokalisiert sind [Brown and Goldstein (1986), Veniant (1998)]. Freies Cholesterin kann entweder in die Lysosomenmembran insertiert und von dort zur PM transportiert werden, oder es wird zum ER transportiert, wo es von der ACAT reverestert und in zytoplasmatischen Droplets abgespeichert wird [Vance and Vance (1996); Lange (1991)]. Diese Cholesterin-Ester befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht und werden bei Bedarf von der neutralen Cholesterinester-Hydrolase (NCEH) oder der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) wieder hydrolisiert [Hui (1996)].

Übersteigt trotz der Feedback-Regulation des LDL-Rezeptor (exogenes Cholesterin) auf die beiden Enzyme in der Mevalonat-Synthese, die HMG-CoA-Synthase und die HMG-CoA-Reduktase (endogenes Cholesterin) die zelluläre Cholesterinkonzentration den physiologischen Wert, hat die Zelle die Möglichkeit über die Steigerung des Cholesterin-Efflux (reverser Cholesterintransport) [Schmitz et al. (1993)] das überschüssige Cholesterin zu limitieren. Die meisten Körperzellen sind mit Hilfe dieser Mechanismen in

der Lage, sich vor einer Überladung mit Cholesterin zu schützen, wobei Makrophagen eine Sonderstellung einnehmen. Über die Scavenger-Rezeptoren können sie chemisch-modifizierte Lipoproteine unreguliert aufnehmen. Bei Akkumulation der Cholesterin-Speicher transformieren die Makrophagen zu Schaumzellen [Brown and Goldstein (1983)].

Der reverse Cholesterintransport besteht im wesentlichen aus zwei Komponenten: 1. der Abgabe von zellulärem Cholesterin an einen Akzeptor, wie HDL oder apo A-I und 2. dem Transport des Cholesterins vom Akzeptor zur Leber, wo es von den Hepatozyten katabolisiert werden kann [Fielding and Fielding (1995); Johnson et al. (1991); Mendez and Oram (1997); Pieters et al. (1994) ; Oram and Yokoyama (1996); Hill and McQueen (1997)]. Zum Mechanismus der zellulären Cholesterinabgabe und Bindung gibt es mehrere Hypothesen. Hinterfragt werden muß, ob einerseits der Rezeptor Cholesterin nur aus der PM aufnehmen kann, ob eine Endo-Exozytose des Rezeptors mit Aufnahme intrazellulären Cholesterins stattfindet und ob zum anderen die Zelle Cholesterin sezernieren kann. Wahrscheinlich ist, dass die verschiedenen Vorgänge zur Cholesterinabgabe nebeneinander existieren können.

Die Abgabe von Cholesterin aus der Membran an Akzeptoren ist eine ohne Energieverbrauch ablaufende Diffusion, die vom Konzentrationsgradienten und der Zusammensetzung der beteiligten Membranen und Akzeptoren bestimmt wird. So kann durch proteinfreie Phospholipid-Vesikel, Albumin, synthetische Cyclodextrine oder trypsiniertes HDL₃ ein langsamer und nichtsättigbarer Cholesterinefflux aus allen Zelltypen induziert werden. Diese Form des Cholesterinefflux kann nicht durch Hemmung intrazellulärer Transportprozesse oder durch limitierte Proteolyse der Plasmamembran unterbunden werden, und ist somit unabhängig von Rezeptorinteraktionen oder der Aktivierung zellulärer Transportprozesse. Unterstützt wird dieser Prozess durch verschiedene lipidmodifizierende Enzyme, wie die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und Transferproteine, wie das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) und die Apolipoproteine, die als Katalysatoren wirken. Obwohl dieser passive Efflux zu einem Verlust an Plasmamembrancholesterin führt, werden die intrazellulären Cholesterinesterspeicher nur zu einem geringen Grad depletiert.

Im Gegensatz dazu induziert freies apoA-I einen schnellen, sättigbaren Efflux von Cholesterin und Phospholipiden, der zu einer effizienten Reduzierung der Cholesterinesterspeicher führt. ApoA-I vermittelter Lipidefflux wurde an humanen Hautfibroblasten, Makrophagen und glatten Muskelzellen nachgewiesen, wobei die meisten derzeit verfügbaren Daten von Untersuchungen an Fibroblasten stammen. Der apoA-I

induzierte Lipidefflux kann durch limitierte Proteolyse der Plasmamembran, niedrige Temperaturen, sowie die Blockade der Golgi-Funktion gehemmt werden, und ist somit abhängig von spezifischen Interaktionen mit der Plasmamembran und einer intakten Funktion des Golgi-Apparates.

Durch die Bindung von HDL an spezifische Oberflächenrezeptoren könnte Cholesterin aus intrazellulären Speichern mobilisiert werden und eine Translokation zur Plasmamembran die Folge sein. Hierbei spielen die Konzentration an cAMP und die Signaltransduktion induzierende PKC eine Rolle [Mendez et al. (1991)].

HDL könnte von der Zelle auch internalisiert werden, um dort intrazelluläres Cholesterin aufzunehmen und nachfolgend wieder resekretiert zu werden, ein Prozeß, der als Retroendozytose beschrieben wird [Schmitz et al. (1985)]. Wie später noch erläutert wird, ist bei der Tangier Erkrankung eine Störung dieses intrazellulären Weges vorhanden. Nach wie vor ist nicht ganz klar, welcher Rezeptor HDL bindet, sicher ist, dass apo A-I der wichtigste Ligand für diese Bindung ist.

Bei der Auftrennung der HDL mit der präparativen Isotachophorese am hiesigen Institut konnten drei unterschiedliche HDL-Partikel mit verschiedenen Bindungseigenschaften und Fähigkeit zur Cholesterinmobilisierung isoliert werden [Nowicka et al. (1990)]. Die apo A-I reichsten HDL besitzen eine hohe Bindungsfähigkeit an spezifische Rezeptoren und können Cholesterin aus der Zelle mobilisieren. Eine langsam laufendere HDL-Fraktion bindet mit geringer Affinität an die Zellmembran und ist nicht in der Lage, einen Cholesterin-Efflux zu unterhalten. Diese Fraktion enthält vorwiegend ApoE, Apo A-II und C-Apolipoproteine. Die dritte Fraktion der HDL ist reich an apo A-I, apoA-IV, LCAT und CETP. Diese Fraktion bindet wieder an die Zelle und kann einen effektiven Cholesterinefflux induzieren.

Neben dieser Cholesterinmobilisierung können Zellen nach Cholesterinbeladung aus Lysosomen oder zytoplasmatischen Lipidpools phospholipid- und cholesterinreiche Partikel, sog. Lamellar Bodies bilden. Diese können entweder mit der PM verschmelzen oder ihre Lipide an internalisierte HDL abgeben [Schmitz et al. (1991)].

Sämtliche Prozesse der Cholesterin-Mobilisierung sind eng mit dem Phospholipidstoffwechsel verbunden. Neuere Daten sprechen dafür, dass der Efflux von Phospholipiden dem von Cholesterin vorausgeht und durch die Assoziation von Phospholipiden mit apoA-I ein potenter Cholesterinakzeptor entsteht, der in einem sekundären Schritt den Cholesterinefflux induziert. Die Bereitstellung von Phospholipiden und Sphingomyelin scheint für die Cholesterin-Ausschleusung essentiell zu sein [Schmitz et al. (1990)].

1.1.4.2. Weitere protektive Eigenschaften der HDL in der Arteriosklerose

Unabhängig von der Rolle der HDL im reversen Cholesterintransport können direkte Einflüsse auf die Generation eines Atherom vom HDL ausgehen. Es wurde schon sehr früh gezeigt, dass HDL-Partikel die Zytotoxizität von LDL-Partikeln auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen antagonisieren können [Hessler et al. (1979)]. Dabei ist denkbar, dass die Effekte u.a. auf die Lipidperoxidation zurückzuführen sind, die von speziellen HDL-Subfraktionen und deren assoziierten Enzymen ausgehen [Navab et al. (1998)]. *In vitro* wurde gezeigt, dass der protektive Effekt der HDL darin besteht, LDL vor der Oxidation zu schützen, wobei die Paraoxonase eine wichtige Rolle spielt. Sie kann die durch Kupferionen induzierte Bildung von Lipoperoxiden und thiobarbituratsäureaktiven Substanzen in LDL signifikant vermindern. Somit vermittelt die Paraoxonase einen physiologischen Schutz vor oxidativer Modifikation von Lipoproteinen [Mackness et al. (1991)].

In einer Arbeit mit apoE-knockout-Mäusen konnte die intravenöse Verabreichung von rekonstituiertem HDL (rHDL) die Folgen einer mechanisch ausgelösten Arterienverletzung deutlich vermindern. Es konnte die Reduktion der VCAM-1-Expression und die Verminderung der Monozyten/Makrophagen-Infiltration erreicht werden [Dimayuga et al. (1999)]. In apoE-knockout und human apoA-I-transgenen Mäusen wurde allerdings gezeigt, dass die präläsionalen Ereignisse, wie die subendotheliale Lipidablagerung, VCAM-1-Expression und die Monozyten-Bindung nicht beeinflussbar waren. Nur die nachfolgende Formation von Schaumzellen konnte in diesem Tiermodell inhibiert werden [Dansky et al. (1999)].

HDL ist in der Lage, die Rekrutierung der Monozyten an die Gefäßwand und deren nachfolgende Adhäsion und Transmigration zu inhibieren. Isoliertes Plasma-HDL und rHDL vermindert die $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 induzierten endothelialen Adhäsionsmoleküle in einer Dosis-abhängigen Weise. Die basalen m-RNA-Level von VCAM-1 und E-Selektin werden durch physiologische Konzentrationen von HDL signifikant reduziert [Cockerill et al. (1999), Cockerill et al. (1995); Calabresi et al. (1997); Baker et al (1999), Baker et al. (2000)].

Werden Endothelzellen mit gereinigtem HDL oder rHDL und mit $\text{TNF}\alpha$ kostimuliert, so kann HDL die Zellen vor der Aktivierung schützen. Dabei kann die Expression der Adhäsionsmoleküle (E-Selectin, VCAM und ICAM) auf 20% der mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten Expression inhibiert werden. In ähnlicher Weise wirkt in diesem Zusammenhang das Zytokin (TGF- β). Beide (TGF- β und HDL) wirken somit inhibierend auf die endotheliale Aktivierung und tragen damit anti-inflammatorisch und antiatherogen zur Prävention der

Arteriosklerose bei [Vadas, et al. (1997)]. In einer nachfolgenden Studie wurden die HDL-Subfraktionen untersucht, wobei die HDL₃-Subfraktion in ihrer Fähigkeit die Expression der Adhäsionsmoleküle aktivierter Endothelzellen zu inhibieren weitaus kompetenter war als die HDL₂-Subklasse [Ashby et al. (1998)]. Der Effekt auf die TNF α -induzierte Adhäsionsprotein-Expression verläuft über den Sphingosin-Kinase-Signaltransduktionsweg. HDL ist in der Lage die Aktivierung der Sphingosin-Kinase und damit die Produktion von Sphingosin-1-Phosphat zu inhibieren. Die Reduktion von Sphingosin-1-Phosphat führt zur verminderten Expression der Adhäsionsmoleküle [Xia et al. (1999)].

Die Adhärenz der Monozyten an das Endothel wird vermittelt über die Interaktion der β_1 - und β_2 -Integrine mit den endothelialen Adhäsionsmolekülen, z.B. CD49d/CD29 und CD11a,b/CD18. Die Expression dieser komplementären Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Zellen des mononukleären Systems wird als diagnostischer Marker für die aktive Entzündung eingesetzt [Cotran and Mayadas-Norton (1998)]. In einer Arbeit von Moudry et al. wurde gezeigt, dass die LPS und TNF α -induzierte Adhärenz polymorphonukleärer Leukozyten (PMN) an das Endothel durch rHDL reduziert wird. FACS-Analysen zeigten, dass die PMNs nach der Behandlung mit rHDL resistent gegenüber der fMLP-induzierten Hochregulation der CD11b/CD18-Expression sind. Hier wirkt HDL über zwei Mechanismen die Zelladhärenz zu verringern: über das Blockieren der LPS-Aktivität und in der Modulation der Integrin-Expression [Moudry et al. (1997)].

Darüber hinaus ist bekannt, dass HDL LPS binden und damit die Endotoxin-induzierte Signaltransduktion modulieren kann. *In vitro* kann rHDL die LPS induzierte TNF α -Produktion stark vermindern. Auch die prophylaktische Infusion von rHDL im Tiermodell reduziert die spätere LPS-induzierte Zytokin-Produktion. Die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 kann potent reduziert werden, wohingegen die Produktion von IL-1 nicht beeinflusst wird. Die isolierten Monozyten in diesem Modell zeigten eine verminderte Expression des LPS-Rezeptors CD14. Ob die zuletzt beschriebenen Funktionen im Zusammenhang mit der Entstehung atheromatöser Veränderungen stehen, ist unklar [Baumberger et al. (1991); Pajkrt et al. (1996); Casas et al. (1995), Parker et al. (1995)].

Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass HDL signifikant die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR2 reduzieren und damit die MCP-1 vermittelte Chemotaxis von Monozyten und die nachfolgende Akkumulation in der Arterienwand unterbinden kann. *In vivo* konnte eine Steigerung der CCR2-Expression in

hypercholesterinämischen Patienten gefunden werden. Die physiologische Relevanz der veränderten CCR2-Expression wurde durch einen Chemotaxis-Assay an THP-1-Zellen gezeigt. Werden THP-1-Monozyten mit LDL stimuliert, so zeigen sie eine erhöhte CCR2-Expression und eine gesteigerte MCP-1-vermittelte Chemotaxis. Im Gegensatz dazu verringert die Inkubation mit HDL die CCR2-Expression und damit die Chemotaxis signifikant [Han et al. (1999); Han et al. (1998)].

In einer Arbeit mit Mono-Mac-6-Zellen konnte anhand von FACS-Analysen ermittelt werden, dass entlang eines MCP-1-Gradienten transmigrierende Zellen eine höhere CCR2-Expression als nicht migrierende Zellen aufweisen. Die Stimulation der Monozyten mit oxLDL vermehrt die CCR2-Protein- und mRNA-Expression, so dass die transendotheliale Chemotaxis gesteigert werden konnte [Weber et al. (1999)].

Im Tiermodell mit Doppelmutanten (apoE^{-/-} und CCR2^{-/-}) wurde demonstriert, dass unabhängig vom Lipidstatus, die Doppelmutante im Gegensatz zu der Einfachmutante (apoE^{-/-}) eine Reduktion in der Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen zeigt. Diese Arbeit demonstriert, dass der MCP-1-Rezeptor direkt in funktioneller Beziehung steht mit der Akkumulation zirkulierender Monozyten in der Arterienwand [Dawson et al. (1999)].

Hier konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass HDL in die verschiedenen Schritte der Leukozyten-Rekrutierung zur Gefäßwand involviert ist.

Da die Entstehung der Arteriosklerose als ein multifaktorielles Ereignis eingestuft wird, ist davon auszugehen, dass HDL über die Einwirkung auf verschiedenen Ebenen antiatherogen und antiinflammatorisch agieren kann.

Neben der Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand, führt die Störung der endothelialen Integrität zur Aktivierung der zellulären und plasmatischen Gerinnung, und über die veränderte Sekretion von Mediatoren zu Vasokonstriktion und Neointima-Formation. Hierbei ist vor allem die verminderte Freisetzung von NO aus den Endothelzellen ein zentraler Prozess. NO bewirkt unter anderem eine Vasorelaxation und eine Hemmung der endothelialen Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten. Ox-LDL vermindern die Freisetzung von NO durch Verdrängung der endothelialen NO-Synthase aus Raftdomänen. Dieser Prozess wird durch HDL verhindert. In Einklang mit diesem Effekt von HDL auf Raft assoziierte Prozesse konnte die Modulation verschiedener Raftdomänen durch HDL₃ bzw. apoA-I gezeigt werden [Drobnik et al. (2001)]. Weitere protektive Effekte von HDL umfassen eine Hemmung der Ox-LDL- oder TNF- α -induzierten Apoptose von Endothelzellen, eine Blockade der Komplement-vermittelten Zelllyse, sowie eine Stimulation der PGI₂ Freisetzung aus Endothelzellen.

PGI₂ ist ähnlich wie NO ein Vasodilator und wirkt somit einer Vasokonstriktion entgegen. Die Stimulation der PGI₂ Sekretion durch HDL beinhaltet verschiedene Mechanismen, wie die Bereitstellung von Arachidonsäure für die Prostaglandinsynthese und eine HDL induzierte Expression der Cyclooxygenase 2 (COX-2), dem limitierenden Enzym der Prostaglandinsynthese in Endothelzellen.

1.2. Die Proteine der Rho-Familie als zentrale Regulatoren der Zytoskelettorganisation

1.2.1. Allgemeines Wirkprinzip und Regulation

Die Proteine aus der Rho-Subfamilie gehören der Ras-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine (GTPasen) an. Zu dieser Superfamilie zählen drei weitere Subfamilien: die Rab-Proteine, ARF-Proteine und die Ran-Proteine [Hall (1994); Glomset and Farnsworth (1994)]. Diese GTPasen nehmen in der Kontrolle und Regulation zellulärer Funktionen eine zentrale Rolle ein [Symons (1996) Takai et al. (1995)]. Jedes dieser Proteine kann durch Mutation als Onkogen wirken, wobei für die Ras-Proteine die höchste Onkogenität nachgewiesen werden konnte.

Subfamilie	Mitglieder	biologische Funktion
Ras	H-ras/Ki-ras/N-ras; R-ras; rap1A/B; rap2A/B; ralA/B; TC21	Wachstums-Differenzierung
Rho	rho A/B/C; rhoG; rhoE; rac1/2; CDC42/G25K; TC10	Integrin-Aktivität; Actin-Zytoskelett; vesikulärer Transport; Stimulation der PLD; NADPH-Oxidase-Aktivität
Rab	rab1-rab30	Vesikulärer Transport
ARF	ARF1-ARF6	Vesikulärer Transport, Stimulation der PLD
Ran	Ran1	Nukleärer Proteintransport

Tab. 2: Mitglieder der mammalien Ras-Superfamilie der GTP-bindenden Proteine

Sie fungieren als molekulare Schalter, regulieren vor allem Signaltransduktionswege zwischen Plasmamembran-Rezeptoren und dem Zytosol, wobei der Austausch zwischen GTP/GDP (GTPase-Reaktion) die zentrale Schaltstelle in der Regulation ist [Bar-Sagi and Hall (2000)]. Die GTPasen unterliegen einer Konformationsänderung, wenn sie im GTP-gebundenen (aktiven) Zustand vorliegen, wodurch die Bindungsstelle für die Zielproteine zugänglich wird. Im inaktiven Zustand verweilen die Proteine im Zytosol und sind mit einem Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor (Rho-GDI) komplexiert. In die aktive Form werden die GTPasen durch einen weiteren Faktor, dem Guanin-Nukleotid-Exchange-Faktor (GEF) überführt, der die Dissoziation vom GDP fördert. Diese Regulatoren bilden im Zytosol 1:1-Komplexe mit den GTPasen. Der Aktivierungszyklus wird geschlossen, indem die GAPs (GTPase-Aktivating-Proteine) die normalerweise langsam ablaufende Hydrolyse von GTP zu GDP um mehrere Größenordnungen beschleunigen, um die Proteine wieder in den inaktiven Zustand zu überführen. GAPs sind somit Negativ-Regulatoren und selbst Signaltransduktionsmoleküle. Verschiedene Phospholipide und deren Spaltprodukte modulieren die GAP-Aktivität. Die GAPs können allerdings die GTPase-Reaktion (Austausch von GTP nach GDP) selbst nicht induzieren, sondern nur beschleunigen. Dabei begünstigen sie die Konformationsänderung während den Hydrolyseschritten. Hier ist anzunehmen, dass sie den Rate-limitierenden Isomerisierungsschritt katalysieren und den Übergangszustand während der Phosphatabspaltung stabilisieren [Wittinghofer et al., (1997)].

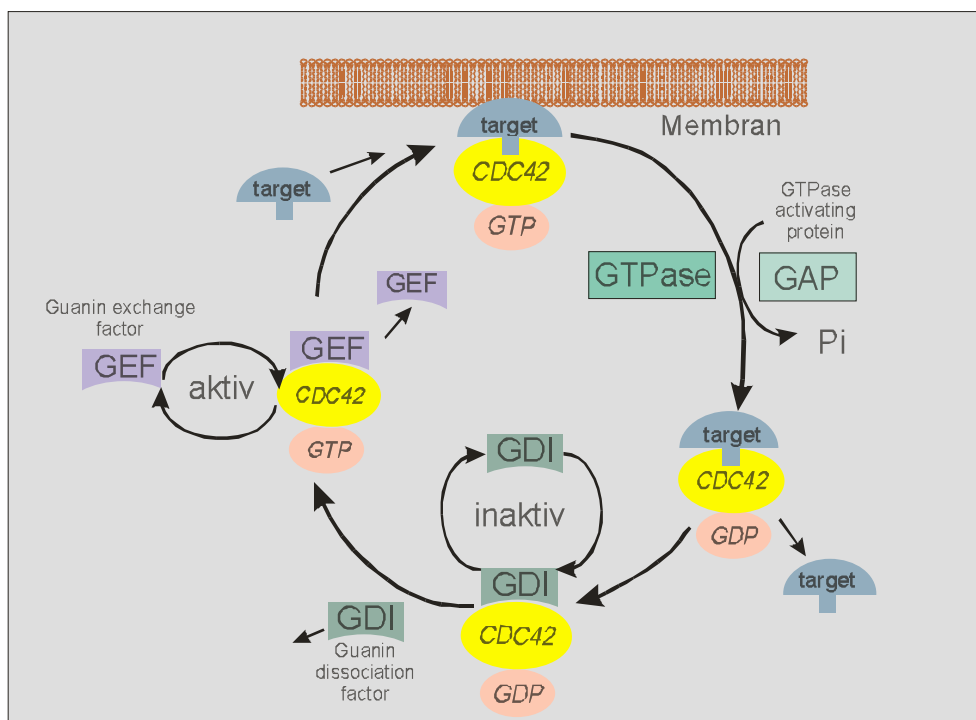


Abb.2: Wirkmechanismus der GTPasen

Im GTP-Protein liegen neben den Domänen für die Bindung der Effektoren, Zielproteine und Guanin-Nukleotide auch konservierte Domänen für die Isoprenylierung vor, die verantwortlich für die Membranbindung sind. Die Isoprenylierung findet bei den Mitgliedern der Rho-Familie am C-terminalen, konservierten Cystein 186 statt. Die posttranslationale Modifikation verläuft über drei Schritte: 1. Prenylierung des Cysteins durch spezifische Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Transferasen, 2. proteolytische Spaltung der letzten drei Aminosäuren durch spezifische Endoprotease und 3. das entstandene Carboxylat des Cysteins wird methyliert. Die Proteine werden entweder einfach farnesyliert, dann methylverestert, einfach geranylgeranyliert und methyliert oder doppelt geranylgeranyliert, wenn zwei Cysteine vorhanden sind [Parish and Rando (1996); Marshall (1993), Glomset and Farnsworth (1994)]. Durch die Isoprenylierung wird die Hydrophobizität der normalerweise löslichen Proteine verstärkt. Es gibt zwei denkbare Möglichkeiten wie die Assoziation an Membranen vollzogen werden kann. Beim einfachen Mechanismus assoziieren die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkung mit der Membran, wobei der isoprenylierte Cysteinanteil mit Phospholipiden an der Membranoberfläche interagiert. Beim zweiten Mechanismus liegt eine Lipid-Protein-Wechselwirkung vor. Hier bindet der isoprenylierte Anteil spezifisch an einen Proteinrezeptor. Eine Lipid-Lipidwechselwirkung läßt keine spezifische Bindung an Membranen zu, zumal die Proteine gleich modifizierte Prenylgruppen aufweisen. Diese Überlegung spricht für die Rezeptortheorie, da hier das Protein spezifisch mit Membranrezeptoren oder anderen Proteinrezeptoren binden kann, um so die vielseitigen Funktionen dieser Proteine zu modulieren [Wittinghofer et al (1997)].

Die Faktoren der Regulation sind also zahlreich. Sie schließen die Enzyme der kovalenten Modifikation, Proteinkinasen und die Faktoren, die den Nukleotidstatus bestimmen, ein. Die Proteinkinasen können die Proteine an den polybasischen Regionen, die von Serin- und Threonin-Resten unterbrochen sind, phosphorylieren.

Bei der Aktivierung der GTPasen handelt es sich also nicht um ein einfaches „Ein- und Ausschalten“, sondern um ein Zusammenspiel vieler Faktoren auf den verschiedenen zellulären Ebenen. Die zahlreichen Funktionen sind zellspezifisch und werden von den unterschiedlichsten externen wie internen Stimuli bestimmt. Zu den externen Stimuli gehören u.a. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Integrine. Zu den internen Faktoren gehören der Lipidstatus, die Ca^{2+} -Konzentration und die subzelluläre Verteilung der GTPasen. Zu den Mitgliedern der Rho-Familie gehören die Rho-Proteine selbst (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), Rnd (RhoE, Rho6, Rho7) und CDC42 (CDC42Hs, G25K, TC10). Jedes dieser Mitglieder kann multiple Funktionen in der Zelle

übernehmen und besitzt die verschiedensten „downstream“-Effektoren. Welche Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt wird, hängt vom Zelltyp, den Stimuli, ihren Regulatoren und der Interaktion mit den „downstream“-Targets zusammen. Die Mitglieder aus dieser Subfamilie können auch im Zusammenspiel miteinander agieren, um eine zelluläre Antwort zu modulieren [Mackay and Hall (1998); Kjoller and Hall (1999); Matozaki et al. (2000); Bokoch (2000)].

Die Funktionen der Rho-Proteine sind also vielfältig und eine vollständige Aufzählung ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Allerdings soll auf ein Mitglied dieser Subfamilie näher eingegangen werden, nämlich auf das CDC42-Protein. Dieses Protein wird als Hauptkandidat in dieser Arbeit für die experimentellen Untersuchungen einen Schwerpunkt darstellen. Allerdings werden bei der Darstellung der zellulären Funktionen dieses Proteins die anderen Rho-Proteine in der Regulation der Signaltransduktionskaskaden immer wieder eine Rolle spielen.

1.2.2. Cell Division Cycle Protein 42 (CDC42)

Das CDC42-Protein ist als Cell-Division-Cycle-Protein 42 zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und kloniert worden. In Hefe ist es für die Zellpolarisierung im Rahmen des „Budding“-Prozesses der Tochterzellen verantwortlich. CDC42 ist 25kDa groß und sein humanes Homolog wurde 1990 von Shinjo et al. [Shinjo et al. (1990)] kloniert. Die AS-Sequenz ist gegenüber den anderen Mitgliedern aus der Ras-Superfamilie stark homolog. Die höchste Homologie findet man zum *Saccharomyces cerevisiae* „cell division cycle protein“ CDC42. Munemitsu et al. [Munemitsu et al. (1990)] identifizierten dieses als das humane Homolog des CDC42-Genprodukts. Später wurden zwei murine Isoformen identifiziert, die durch alternatives Splicing aus einem Gen entstehen [Marks and Kwiatkowski (1996)]. Die erste Isoform ist ubiquitär, die zweite hingegen nur im Gehirn exprimiert. Das humane Homolog der beiden ist auf dem Chromosom 1p36.1-p35 gemappt [Jensen et al. (1997); Schuler et al. (1996)]. Posttranslational ist CDC42 am C-Terminus geranylgeranyliert, welches die Assoziation mit der PM erlaubt [Kozminski et al. (2000)]. Zwei Domänen, Switch I und Switch II sind mitverantwortlich für die Bindung an die Effektorproteine und unterliegen einer Konformationsänderung, wenn CDC42 in der GTP-gebundenen Form vorliegt. Insgesamt besitzt CDC42 6 funktionelle Domänen: P-Loop, Switch I, Switch II, Rho-Insert, α 5-Helix und die polybasische Domäne, die für die Interaktion mit der PM und den Regulatoren verantwortlich ist [Kozminski et al. (2000)]. *In vitro* Mutagenese-Experimente in Hefe zeigten, dass Mutationen in der Switch I-Domäne ein Ausbleiben

der Aktin-Neuverteilung in der G2-Phase während des Budding-Prozesses verursachen. Mutationen in der Switch II-Domäne verursachen eine fehlerhafte Bindung an die GAP-Proteine, so dass CDC42 in einem konstitutiv aktivierten Zustand vorliegt. Biochemische Studien am CDC42-GAP zeigten, dass die drei für die Aktivität erforderlichen Domänen den größten Teil der Bindungsoberfläche mit dem CDC42-Protein ausmachen. Diese Domänen bilden mit der Switch I/II-Region und mit dem P-Loop des CDC42 umfassende Wasserstoffbrückenbindungen aus [Leonard et al. (1998)]. In einer Arbeit von Zhang und Zheng konnte gezeigt werden, dass CDC42 sowohl in der GTP als auch in der GDP-gebundenen Form mit hoher Bindungsaffinität reversible Homodimere bilden kann. Die Dimerisierung verläuft über die carboxyl-terminale polybasische Domäne. Bei der Bildung dieser Homodimere im GTP-CDC42 wird die innewohnende GTPase-Aktivität gesteigert. Die nicht GAP-Protein abhängige GTP-Hydrolyse lässt sich mit ansteigender CDC42-Proteinkonzentration beschleunigen, was für eine Negativ-Regulation des CDC42-Proteins in der GTP-gebundenen Form spricht [Zhang and Zheng (1998)].

Die Rho-Insert-Region steht in funktioneller Beziehung mit der Switch I-Region und ist für die Bindung an Zielproteine mitverantwortlich. Neben dieser Region befindet sich die $\alpha 5$ -Helix-Domäne, welche für den intermolekularen Kontakt zuständig ist und somit die Spezifität von CDC42 *in vivo* moduliert. Magnet-Resonanz-Daten zeigen, dass diese Domäne mit dem CRIB (CDC42/Rac-interactive-binding)-Motiv der GTPase-Bindungs-Domäne von verschiedenen Effektoren (WASP, ACK-Tyrosine-Kinase, PAK, IQGAP) interagiert [Guo et al (1998); Morreale et al. (2000), Abdul-Manan et al. (1999), Mott et al. (1999)]. Es wird deutlich, dass die Struktur des Proteins mit der Funktion korreliert und CDC42 nicht nur einfach während der Interaktion mit einem Effektorprotein ein- oder ausgeschaltet wird. Vielmehr fungiert das Protein als eine Art zelluläres Schaltbrett, was in der Lage ist, mit spezifischen Effektoren in einer räumlich und zeitlich regulierten Weise zu interagieren [Li et al. (1999)].

1.2.3. Funktionen von CDC42

Die Funktionen von CDC42 in eukaryontischen Zellen sind vielfältig. Sie reichen von der Regulation der Immunglobulin-Rezeptor-vermittelten Typl-Phagozytose in 3T3-Fibroblasten [Caron and Hall (1998)] und Leukämie-Mastzellen [Massol et al. (1998)] über die Regulation der Integrinaktivität [Clark et al. (1998); Parsons (1996); Price et al. (1998)], den vesikulären Transport [Erickson et al. (1996)], die Regulation des Zellzyklus [Olson et al. (1995)] bis hin zur Regulation von Endo- und Exozytose [Aelst

and D'Souza-Schorey (1997)]. CDC42 reguliert viele Aktin-Zytoskelett-Organisationen, wie Filopodien-Ausbildungen [Zigmond (1996)] oder Fokale-Adhäsions-Komplexe. Aber auch die Apoptose, die Streß-aktivierte Signaltransduktion [Coso et al. (1995), Minden and Karin (1997)] und die Transkription wird von CDC42 kontrolliert.

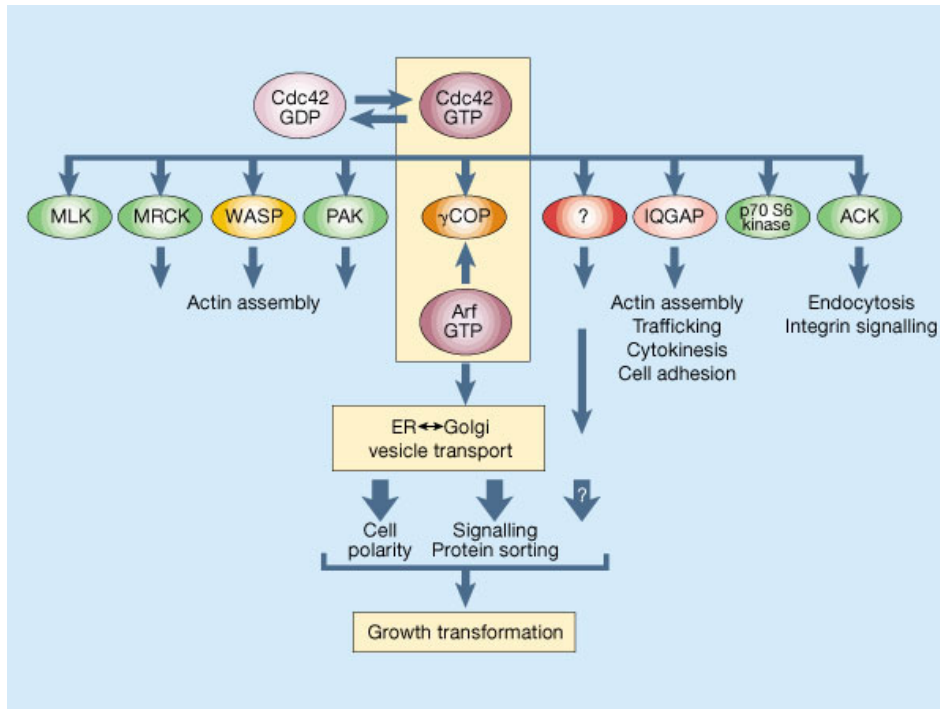


Abb.3: Potentielle Downstream-Effektoren von CDC42 [Bokoch (2000)].

1.2.3.1. Rolle von CDC42 in der Zelladhäsion, -Migration und Chemotaxis

Die Rolle von CDC42 in der Regulation des Aktinzytoskeletts kann bezüglich der Zellbeweglichkeit zellspezifisch über verschiedene Stimuli verschiedene Auswirkungen haben. Oft stehen die Proteine der Rho-Familie in einem funktionellen Zusammenspiel und regulieren über spezifische Rezeptoren Zytoskelett Ereignisse [Takai (1995); Zigmond (1996); Symons (1996); Aspenström (1999)].

In Fibroblasten sind die Rho-GTPasen über Rezeptoren an der Ausbildung der Zytoskelett Zellausläufer beteiligt. Die Proteine können unabhängig voneinander oder auch in sequentiell, koordinierter Weise wirken [Nobes and Hall (1995) Kaibuchi et al. (1999), Mackay and Hall (1998)]. Werden die aktiven Formen der Proteine in 3T3-Fibroblasten injiziert, werden verschiedene Formationen des F-Actin-Zytoskeletts arrangiert. Konstitutiv aktives CDC42 induziert Finger-ähnliche Ausläufer, sog. Filopodien, aktives Rac induziert breite Ausläufer, bezeichnet als Lammellipodien, und aktives Rho induziert Actin-Bündel unterhalb der PM, sogenannte Streßfibers, die den direkten Kontakt zum Substrat herstellen [Nobes and Hall (1995)]. Die Ausbildung der

Filopodien wird über Bradykinin induziert. Die Lamellipodien können über Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF), PMA oder Bombesin, und die „Fokal“-Kontakte von LPA induziert werden. Die Rezeptoren können in allen Fällen Serpentine-Rezeptoren sein, wobei im Fall von Rac auch ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor die Verbindung zu heterotrimeren G-Proteinen herstellen kann. Zwischen den initialen Rezeptoren und den GTPasen sind spezifische Kinasen geschaltet, die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI-3-Kinase) ist erforderlich, wenn die Aktivierung über die Tyrosin-Rezeptoren erfolgt. Für die Aktivierung der Rho-Proteine sind außerdem die spezifischen GEFs erforderlich, die die Proteine in die GTP-gebundene Form überführen. Die GTPasen besitzen weitere Bindungsstellen für PIP_2 oder $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine. Die Liste der „Down-Stream-Targets“, welche die Zytoskelett Ereignisse vermitteln, ist lang.

Allerdings kann man potentiell die Zytoskelett-Proteine der F-Aktin-Polymerisation benennen. Diese Proteine sind die Filament „Capping“- und „Severing“-Proteine wie Gelsolin, Tropomyosin, das Capping-Protein Cofilin und die „Actin-binding“-Proteine z.B. Profilin, Vinculin, Ezrin, Moesin und Radixin. All diese Proteine werden funktionell über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung gesteuert, welche über die spezifischen Kinasen indirekt der Kontrolle der Rho-Proteine unterstehen [Ayscough (1998); Carlier (1998); Sun et al. (1995); Tanaka and Takai (1998)].

Während der Zelladhäsion und Migration werden verschiedene intrazelluläre Aktin-Pools aktiviert, je nachdem an welchem Ort der Zelle es zur Aktin-Polymerisierung kommen soll. Zudem ist die Formation der Zellfortsätze (Streß-Fibers, Lamellipodien, Filopodien) vom Integrin-Clustering abhängig [Machesky and Hall (1997)].

CDC42 induziert in Fibroblasten als Voraussetzung für die Filopodien-Formation Actin-Mikrospikes, die an der Zellperipherie lokalisiert sind. Diese Formationen sind streng Bradykinin abhängig. Die Stimulation mit Bradykinin führt zur Aktivierung der Phospholipase C, Phospholipase D und zur intrazellulären Ca^{2+} -Ausschüttung. In Fibroblasten ist die CDC42-abhängige Aktin-Formation mit einer basalen Aktivierung von Rac und der Inhibition von Rho verbunden [Kozma et al. (1995); Olivo et al. (2000)].

In Hefe wurde gezeigt, dass das Generieren der kortikalen Actinfilamente abhängig von weiteren Zytoskelett Elementen ist. Es sind die Hefe-Homologe von Myosin 1 und 3. Diese Myosine sind für den Aktin-Polymerisations-Schritt verantwortlich und interagieren direkt mit dem „Aktin-related“-Protein (Arp) 2/3 [Lechner et al. (2000)]. Ein direktes Zielprotein in der CDC42-vermittelten Aktin-Myosin-Zytoskelett-Organisation stellt die p21-activated Kinase (PAK) dar. Diese übernimmt die Phosphorylierung der Myosin-Motor-Domänen [Bokoch (2000)].

Obwohl die Effekte auf die Organisation des Aktin-Zytoskellet in Fibroblasten am besten untersucht sind, werden ähnliche Effekte dieser Proteine in allen eukaryontischen Zellen beobachtet. Die Rho-Proteine regulieren das Aktinzytoskelett in neuronalen Zellen, wie Astrozyten, in Epithelzellen, in Endothelzellen, in Lymphozyten, in Plättchen und in Neutrophilen. Hier soll insbesondere auf die Regulation der Monozyten-Makrophagen-Beweglichkeit durch CDC42 eingegangen werden [Hall (1998); Aspenström (1999)]. Die Aktivierung von CDC42 verursacht in Monozyten die Ausbildung von Filopodien [Allen et al. (1997)]. Die Filopodien werden induziert durch den „Makrophagen-Colony-Stimulator-Faktor“ (M-CSF) und blockiert durch Dominant-Negatives-CDC42. Die Ausbildung von Filopodien bei Monozyten wird als Spreading bezeichnet. Es kann für die Adhärenz, für die Beweglichkeit der Zellen während der Chemotaxis und während der subendothelialen Transmigration von Bedeutung sein. Außerdem ist das Spreading eine Grundvoraussetzung bei der Invasion in Gewebe. *In vitro* wird das Zellspreading durch die Adhärenz der Monozyten an ECM oder durch Chemokine, insbesondere MCP-1, induziert und ist gleichfalls ein Zeichen der Monozyten-Differenzierung [Webb et al. (1996)]. Das Monozyten-Spreading ist ein sequentielles Ereignis, welches die Zellabflachung, die Ausbildung von kleinen „Fokal-Adhäsions“-Komplexen, Formation von neuen Aktinfilamenten und die nachfolgende Ausbildung von Filopodien beinhaltet. Schon früh hat Aepfelbacher et al. postuliert, dass das Monozyten-Spreading von der CDC42-Aktivierung abhängig ist [Aepfelbacher et al. (1994)]. Hier wurde nach Expressionsuntersuchungen die Beobachtung gemacht, dass die Monozyten-Differenzierung mit einem Anstieg in der Proteinexpression von CDC42 begleitet ist. Dieser Anstieg konnte allerdings nicht mit einer erhöhten Transkriptionsrate erklärt werden. Die erhöhte Proteinexpression ist mit der Translokation von CDC42 zur Membranfraktion assoziiert. Weiter wurde der Gehalt an CDC42 in Agonisten stimulierten U-937-Zellen mit der Zahl der CD11b positiven Zellen verglichen. Es zeigt sich, dass in PMA-stimulierten Zellen ca. 60% CD11b positiv sind, und die zelluläre Konzentration von CDC42 eben dieser Zellen am höchsten ausfällt. In einer Folgepublikation konnte gezeigt werden, dass RhoA als Negativ-Regulator im Monozyten-Spreading fungiert [Aepfelbacher et al. (1996)]. Blutmonozyten und PMA stimulierte U-937/THP-1-Zellen wurden mit der Clostridium botulinum C3-Transferase behandelt, die spezifisch das RhoA-Protein ADP-ribosyliert und damit in situ inaktiviert. Diese Stimulation der Zellen bewirkt einen erheblichen Anstieg im Zellspreading. Die Kontrollzellen zeigen nach 24 stündiger Inkubation 10% Spreading, die mit der C3-Transferase stimulierten 50%. Blutmonozyten, die auf Fibronectin-„gecoatete“ Schalen

plattiert werden, zeigen nach Inhibition von RhoA ebenfalls einen signifikanten Anstieg in ihrem Spreading-Verhalten. Die behandelten Zellen nehmen eine größere Spreading-Fläche ein und zeigen verlängerte Filopodien-Ausbildungen und Actin-Akkumulation in der subkorticalen Region. Diese zellulären Veränderungen korrelieren mit der Translokation von RhoA in das Zytosol und einer Zunahme der CDC42-Expression und Translokation von CDC42 zur Membranfraktion.

Allen et al. beschreiben detailliert die Rolle von CDC42 im Makrophagen. Die Untersuchungen werden an M-CSF abhängigen Bac1.2F5-Zellen vorgenommen [Allen et al. (1997)]. M-CSF stimuliert die Proliferation der Zellen und induziert als Chemoattraktant deren Beweglichkeit. Die unstimulierten Zellen zeigen eine abgerundete Zell-Morphologie, die stimulierten dagegen bilden rasch Filopodien aus. Die gespreadeten Zellen besitzen Adhäsionskomplexe, die $\beta 1$ -Integrine, die pp125 FAK-Kinase, Paxillin und Vinculin enthalten. Nach M-CSF-Entzug runden die Zellen ab und besitzen ein zerstreut verteiltes Aktinzytoskelett. Bei den hungernden Zellen stellt sich nach Injektion mit aktivem CDC42 die Filopodien-Ausbildung wieder ein. Die CDC42 vermittelte Filopodien-Formation kann durch $\text{TNF-}\alpha$ inhibiert werden. Die Zellmutante kann M-CSF-Konzentrationsabhängig aktiv sein. Bei geringer Mutantenaktivität werden an Stelle von Filopodien Lammellipodien ausgebildet, die der Kontrolle von Rac unterstehen. In diesem Makrophagen-Modell steht CDC42 in der Hierarchie ganz oben. RhoA induziert die Formation von kontraktile Aktin-Myosin-Filamenten, es kommt zur Zellabrundung.

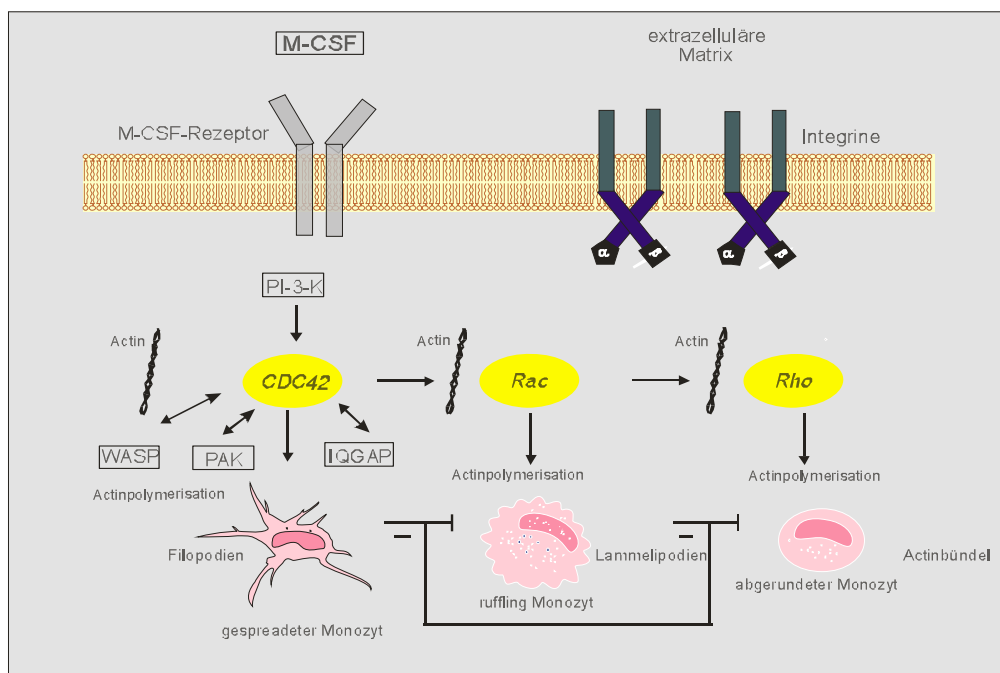


Abb.4: Modell der Interaktion zwischen CDC42, Rac und Rho in Monozyten und Makrophagen

Bekannt ist, dass $\text{TNF-}\alpha$ die Makrophagen-Migration und Chemotaxis reguliert, da es als proinflammatorisches Zytokin die Synthese und Sekretion weiterer Zytokine triggert. Der Lokomotionswechsel während der Chemotaxis bedarf der kontrollierten Aktin-Zytoskelett-Organisation, wobei die Filopodien als chemotaktische Sensoren benutzt werden können. $\text{TNF-}\alpha$ besitzt über seinen Rezeptor Einfluß auf den CDC42-Signaltransduktionsweg. Durch Rezeptor-Mutanten konnte gezeigt werden, dass zwei Membran-proximale Regionen für die Regulation des Aktinzytoskeletts verantwortlich sind. Nach Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ kommt es zur Rezeptorakkumulation, die mit der Rekrutierung von Adapter- und Linkermolekülen zum intrazellulären Teil des Rezeptors einhergeht, und somit wird der Anschluß an die Signaltransduktion hergestellt. Ein p38MAP-Kinase-Inhibitor kann die $\text{TNF-}\alpha$ induzierte Inhibition der Filopodienausbildung aufheben. Wird hingegen die p38MAP-Kinase-Aktivität durch Ceramid aktiviert, wird die CDC42-abhängige Filopodien-Produktion reduziert. Somit vermittelt der Rezeptor seine Aktivität über die p38MAP-Kinase auf CDC42 [Peppelenbosch et al. (1999)].

Die Rolle von CDC42 in der Makrophagen-Migration und Chemotaxis wurde von Allen et al. [Allen et al. (1998)] untersucht. Die verwendete Zelllinie ist abhängig vom „Colony Stimulator Factor“ (CSF-1) als Chemoattraktant für die Migration und Chemotaxis. Die Mikroinjektion der aktiven Mutante von CDC42 verursacht ein Verlangsamen der Migrationsrate im CSF-1-Konzentrations-Gradienten. Die negative Mutante verhindert die gerichtete Polarisierung der Zellen entlang des CSF1-Gradienten, beschleunigt allerdings die Migration. Da CDC42 die Formation von Adhäsions-Komplexen reguliert, ist anzunehmen, dass aktiviertes CDC42 in diesem System die Adhärenz zum Substrat verstärkt, und somit die Zellen ihre Migration verlangsamen. Die Ausbildung von Filopodien während der Chemotaxis ist somit erforderlich als Sensor für den Chemoattraktant im Gradienten. In diesem Modell kommt CDC42 als Stimulator der Filopodien-Formation die Aufgabe zu, den Gradienten zu detektieren und die Zellpolarisierung zu initiieren. Hingegen sind Rac und Rho nur für die Migration der Zellen verantwortlich. [Webb et al. (1996), Peppelenbosch et al. (1999)]. Der M-CSF-Rezeptor wird nach der Stimulation mit CSF-1 internalisiert, so dass vorübergehend die Zelle nicht in der Lage ist, den Gradienten zu detektieren. Das früheste Ereignis nach der Stimulation ist die Ausbildung von Filopodien, die im Weiteren das Sensoring im Gradienten übernehmen [Jones et al. (1998)].

In einer Mono-Mac-Zelllinie, die die Chemokin-Rezeptoren CCR1/2 für $\text{MIP-1}\alpha$ und MCP-1 trägt, werden die Mutanten Formen von CDC42 auf die Fähigkeit getestet, die Chemotaxis gegenüber diesen Chemokinen zu modulieren. Chemokine wirken über

G-Protein gekoppelte Transmembran-Rezeptoren, um die Chemotaxis und die differentielle Aktivierung von Mac-1 und VLA-4 (CD49d) zu kontrollieren [Weber et al. (1998)]. Bei negativen CDC42-Transfektanten wird nach der Stimulation mit MCP-1 keine typische Filopodien-Ausbildung beobachtet. Im Gegensatz dazu bilden aktive Transfektanten spontan Filopodien aus. Beide CDC42-Mutanten modulieren die MCP-1 und MIP-1 α induzierte Chemotaxis. In diesem System bleibt die Integrin-abhängige Adhäsion an VCAM-1, die durch MIP-1 α stimuliert wird im Vergleich zum Wildtyp, unverändert bei den Transfektanten. Die Stimulation mit dem PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin hingegen inhibiert die MCP-1-induzierte Filopodien-Formation nur im Wildtyp, nicht aber in der aktiven CDC42-Mutante. Das bedeutet, dass die PI-3-Kinase in der Chemokin-induzierten Zellantwort „downstream“ von CDC42 steht. Es wird klar, dass CDC42 in der Gradienten-gerichteten Chemotaxis von Monozyten, welche für die subendotheliale Transmigration erforderlich ist, das Regulator-Protein darstellt.

1.2.3.2. CDC42 und Integrine

Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, die die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrix-Proteine, wie z.B. Fibronectin, Laminin oder Kollagen vermitteln. Auch wird die interzelluläre Adhäsion von Integrinen moduliert. Dabei kann die Bindung an den interzellulären Zell-Adhäsions-Rezeptor (ICAM-1) oder an den Gefäß-Adhäsions-Rezeptor (VCAM-1) stattfinden [Schwartz and Shattil (2000); Clark et al. (1998); Todd and Petty (1997); Parsons (1996)]. Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit besitzen extrazellulär Liganden-Bindungsdomänen, eine einfache Transmembran-Domäne und zytoplasmatische Domänen, die mit zytoskelettalen Proteinen und Proteinen der Signaltransduktion interagieren. Die Bindung der Integrine an die ECM, oder an andere Zellen, verursacht ein laterales Clustern. Dieses Clustern initiiert die Adhäsion und zytoskelettale Organisation in der Zelle. Darüber hinaus werden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, die die Zellmigration, Zellpolarität, Zellwachstum, Differenzierung und Genexpression [Aplin et al. (1999); Giancotti (1997); Howe et al. (1998)] regulieren. Die Proteine, die durch dieses Signalling stimuliert werden, sind u.a. Tyrosine-Kinasen, Serine/Threonin-Kinasen, Lipidkinasen, Membrantransporter und die kleinen GTP-bindenden Proteine [Defilipi et al. (1999); Dib and Andersson (2000), Yang et al. (1999)]. Bezeichnend ist, dass die Integrine, wie auch die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie, dieselben zellulären Ereignisse der Zellbeweglichkeit, Adhäsion und zytoskelettalen Organisation regulieren. Die Regulation scheint eine gegenseitige zu sein.

Adhärenz Zellen auf ECM-Proteine, werden schnell Filopodien oder Lamellipodien ausgebildet, die der Regulation durch CDC42 und Rac unterliegen. Diese Zellausläufer beinhalten „Fokale-Komplexe“, welche Orte des Clusterings von Integrinen, Zytoskelettproteinen und Proteinen der Signaltransduktion darstellen. Zeigen Zellen Spreading, werden größere Strukturen gebildet, die nun als Integrin basierende „Fokale-Adhäsions-Komplexe“ bezeichnet werden und sich im weiteren zu Streßfibern ausbilden können, die der Regulation durch Rho unterliegen [David et al. (1999)]. Diese Strukturen (Streßfibers) werden in Monozyten/Makrophagen nicht beobachtet [Wojcicka-Stothard et al. (1999)]. Es bleibt zunächst ungeklärt, ob die Integrine die biochemische Aktivität der GTPasen kontrollieren, oder ihrerseits nur Orte der Signaltransduktion darstellen, wo die GTPase-abhängigen Effektoren lokalisiert sind.

In Fibroblasten wird die p21-aktivierte Kinase (PAK) rasch durch die Bindung an Fibronectin aktiviert [Price et al. (1998)] oder durch die GTP-gebundene Form von CDC42 oder Rac stimuliert. Der funktionelle Zusammenhang zwischen der Bindung an ECM und der Aktivierung von PAK zeigt, dass die Integrine die Aktivität der GTPasen modulieren können. Die Integrin-abhängige Adhärenz bildet eine Voraussetzung dafür, dass die aktivierten GTPasen mit ihren Effektoren interagieren können. In nicht adhären Zellen kann durch Wachstumsfaktoren zwar eine GTP-Beladung von CDC42 stattfinden, aber diese aktive Form kann die PAK nicht aktivieren.

In umgekehrter Weise lässt sich zeigen, dass die Integrin-abhängige Adhäsion durch die GTPasen reguliert wird. Durch Inhibitionsstudien mit dem C3-Exoenzym, welches Rho inaktiviert, konnte in Plättchen eine Inhibition der Aggregation und in Lymphozyten eine Inhibition der Adhäsion und Aggregation festgestellt werden [Laudanna et al. (1996)]. Allerdings konnte in monozytären Zellen durch die Inhibition von Rho ein vermehrtes $\beta 1$ -Integrin-abhängiges Zellspreading an Fibronectin beobachtet werden, welches von CDC42 moduliert wird [Aepfelbacher et al. (1996)].

Die Integrin abhängige Zellaggregation, Adhäsion und das Zellspreading kann auf verschiedenen Ebenen moduliert werden. Hypothetisch kann die Modulation auf der Ebene der Liganden-Bindungsaffinität, der lateralen Beweglichkeit und des Clusterings der Integrine und schließlich auf der Ebene der Integrin-Zytoskelett-Interaktionen erfolgen.

1.3. Die Tangier Erkrankung als Modell zur Charakterisierung zellulärer HDL-Effekte

1.3.1. Klinik und Pathologie

Die Tangier-Krankheit wurde erstmals von Fredrickson et al. (1961) beschrieben und stellt eine autosomal, rezessiv übertragbare Erkrankung des Lipid- und HDL-Stoffwechsels dar [Fredrickson et al. (1961)]. Gekennzeichnet ist die Krankheit vor allem durch das vollständige Fehlen von lipidreichen α -migrierenden HDL, bei gleichzeitig normalen bis mässig erhöhten Triglyzeriden [Assmann et al (1990)]. Klinisch fallen die homozygoten Patienten durch hyperplastische, orangefarbene Tonsillen, gelbliche Lymphknoten und periphere Neuropathien auf. Weitere klinische Befunde sind Hepatomegalie, Splenomegalie, Korneatrübungen, Thrombozytopenie und orangefarbene Infiltrationen in der Rectummucosa. Die Symptome sind Ausdruck von Cholesterineinlagerungen in den Zellen des retikulo-endothelialen Systems [Assmann et al. 1990]. Pathologisch steht dabei die Cholesterinesteranreicherung in den Histozyten im Vordergrund. Die schaumzellig veränderten Histozyten enthalten sudanophile Lipidtropfen. Dies entspricht Cholesterinestern, die zum größten Teil nicht an Membranen gebunden sind [Assmann et al (1990)]. Die Akkumulation dieser Substanzen steht im Gegensatz zu den Befunden bei anderen Lipid-Speichererkrankungen, denen ein lysosomaler Enzymdefekt mit einer vesikulären Lipidspeicherung zu Grunde liegt [Pentchev et al. (1985)]. Klinisch betrachtet steht im Vordergrund bei den Tangier Patienten die Neuropathie, wobei früher oder später nahezu alle Patienten an einer neuromuskulären Funktionsstörung leiden. Zu Grunde liegt der Neuropathie eine Ablagerung von Cholesterinestern in den Schwann'schen Zellen [Assmann et al (1990)].

1.3.2. Aufklärung des genetischen Defekts bei der Tangier Erkrankung

1.3.2.1. ABC-Transporter

ABC-Transporter sind hochkonservierte Transmembran-Proteine, die für die Translokation verschiedenster Moleküle aus unterschiedlichen Stoffklassen über Membransysteme verantwortlich sind [Higgins (1992)]. Der Transfer von Ionen, AS, Peptiden, Zuckern, Vitaminen, Steroid-Hormonen, Gallensäuren, Xenobiotika und Lipiden ist energieabhängig, wobei die Energie aus der Hydrolyse von ATP stammt. Innerhalb der Zelle können die ABC-Transporter an der PM, an Peroxisomen, am Golgi-

Komplex, am ER und an intrazellulären sekretorischen Vesikeln lokalisiert sein [Bauer et al. (1999)]. Die klassische Funktion einiger ABC-Transporter liegt im Export von zytotoxischen Agenzien und kann in Tumorzelllinien zur Multi-Drug-Resistenz führen [Higgins (1992)], was ursprünglich zur Entdeckung dieser Gen-Familie führte. Die ABC-Transporter bestehen aus zwei tandemartig verknüpften funktionellen Einheiten. Jede Untereinheit beinhaltet eine ATP-Bindungskassette und eine komplex aufgebaute Transmembran-Domäne [Klein et al. (1999)]. Es gibt mehrere Hypothesen dafür wie ABC-Transporter agieren: 1. nach der Aktivierung können die Transporter Membran-Poren formen, um lösliche Substanzen in das extrazelluläre Milieu zu translozieren, 2. durch sterische Veränderungen in der Membran können sie als Flippase agieren oder 3. sie formen einen hydrophoben Raum in der Membran in Form eines „hydrophoben Vacuum-Cleaner“ [Higgins (1994); Ueda et al. (1997); van Veen and Konings (1997)]. Zudem beinhalten sie Bindungsdomänen für verschiedenste Proteine, die u.a. die Verbindung zur Signaltransduktion und dem Zytoskelett herstellen. Neben den klassischen Aufgaben in transformierten Zellen mehren sich die Beweise, dass die ABC-Transporter am zellulären Lipidtransport beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Transporter MDR1 und MDR3 Phospholipide zwischen der inneren und äußeren PM translozieren [Smith et al. (1994), van Helvoort et al. (1996), Crawford et al. (1997)]. Untersuchungen in humanen Zelllinien konnten eine Rolle für MDR1 im Cholesterin-Transport von der PM zum ER zeigen [Luker et al. 1999]. Bei einem anderen Mitglied aus der Unterklasse der „half-size“-Transporter, dem ABCG1 (ABC8), konnte eine Beteiligung im Cholesterin-Transport in Makrophagen postuliert werden [Klucken et al. (2000)]. Für zwei weitere ABC-Transporter, dem ABCG5 und ABCG8 konnte eine Beteiligung in der Cholesterinaufnahme gezeigt werden. Diese beiden ABC-Transporter sind in Patienten mit Sitosterolämie mutiert und in der Leber und dem Intestinum hoch exprimiert. Die Patienten zeigen Xanthome, Prädisposition zur Arteriosklerose und vorzeitiges Risiko zur KHK. Sie besitzen eine erhöhte Absorption und eine verminderte Sekretion von Cholesterin und Sterolen und dadurch eine dramatisch erhöhte Konzentration von Sterolen im Plasma. Durch Cholesterin-Fütterung in Mäusen werden beide Gene hochreguliert. Diese Befunde legen nahe, dass normalerweise ABCG5 und ABCG8 in der Limitation der intestinalen Absorption und nachfolgenden Resektion von Sterolen involviert sind. [Berge et al. (2000); Lee et al. (2001)]. Das Konzept, dass ABC-Transporter auch Funktionen im Lipidtransport übernehmen, konnte nach der Identifikation weiterer ABC-Gene, die eine wichtige Rolle in der Lipoproteinhomöostase übernehmen, geklärt werden.

1.3.2.2. Tangier Erkrankung und ABCA1

Der genetische Defekt der Tangier-Erkrankung konnte 1999 am hiesigen Institut und von anderen Gruppen aufgeklärt werden [Remaley et al. (1999); Bodzioch et al. (1999); Brooks-Wilson et al. (1999); Rust et al. (1999), Brousseau et al. (2000)]. Dabei handelt es sich um Mutationen im ABCA1-Gen, welches einen „full-size“ ABC-transporter (ABCA1) codiert [Broccardo et al. (1999)]. ABCA1 ist exprimiert in verschiedenen Organen, wie der Placenta, der Leber, der Lunge, in adrenalen Drüsen und fetalen Geweben [Langmann et al. (1999)]. Die cDNA-Sequenz kodiert für ein 2201 AS-Protein mit einem Molekulargewicht von 220kDa. Das humane Gen ist lokalisiert auf Chromosom 9q31 und zusammengesetzt aus 50 Exons, welche eine Region von 70kb umspannen [Luciani et al. (1994); Rust et al. (1998)]. Die biologische Funktion konnte im Zusammenhang mit der mutierten Form des ABCA1 in der Tangier Erkrankung gezeigt werden. Hier konnte ABCA1 als Regulator-Protein des HDL-Metabolismus charakterisiert werden [Marcil et al. (1999); Lawn et al. (1999); Hayden et al. (2000); Ordovas (2000)]. Zunächst wurde in humanen Monozyten gezeigt, dass das ABCA1-Protein durch Cholesterinbeladung induziert und durch HDL₃ supprimiert werden kann [Langmann et al. (1999)]. Diese Cholesterin-abhängige Regulation legt nahe, dass ABCA1 im Cholesterin- und Lipidtransport eine entscheidende Rolle spielt. Diese Rolle konnte im Weiteren durch Experimente an Tangier-Monozyten, Tangier Fibroblasten, transfizierten HeLa-Zellen und ABCA1-knock-out Mäusen belegt werden. In differenzierten und mit acLDL beladenen Tangier-Monozyten konnte, im Vergleich zu Kontroll-Monozyten, ein reduzierter Cholesterin und Phospholipid-Efflux zu HDL₃ gemessen werden. Durch Versuche an ABCA1-überexprimierten HeLa-Zellen konnte weitere Evidenz für die Rolle von ABCA1 im apoA-I vermittelten Lipidtransport gefunden werden. Bei den transfizierten Zellen wurde eine deutlich signifikante Steigerung der Efflux-Induktion durch apo A-I erreicht, im Gegensatz zur Kontrolltransfektion, wo keine Induktion zu beobachten war. Die Steigerung ist sowohl beim Cholesterin- als auch beim Phospholipid-Efflux induzierbar. Entsprechend wurde durch die Transfektion auch der HDL₃-vermittelte Efflux gesteigert. Weiter wurde gezeigt, dass die Phospholipide mit einer höheren Effizienz als Cholesterin exportiert werden, wobei beide Lipide in einem zweistufigen Prozeß transloziert werden können [Liebisch (1999)]. Im Einklang damit stehen die Befunde, dass in ABCA1-defizienten Maus-Fibroblasten keine Induktion des apoA-I vermittelten Lipid-Effluxes stattfindet. Diese Daten indizieren, dass ABCA1 über die Vermittlung von Cholesterin-sensitiven Signaltransduktionsprozessen am Transport von Cholesterin und „Cholin-Backbone“-Phospholipide an der PM beteiligt ist. Die

Beobachtung, dass in unstimulierten Fibroblasten ABCA1 auch im Zytosol und an der Golgi-Fraktion zu detektieren ist, legt nahe, dass das Protein auch als bewegliches Molekül zwischen der PM und dem Golgi translozieren kann, welches die klassische vesikuläre Route für neusynthetisiertes Cholesterin in der Zelle darstellt. Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Lipid-Efflux konnte in den ABCA1-defizienten Maus-Zellen das gleiche veränderte Lipidprofil wie in den humanen Tangier Zellen gefunden werden. Sie besitzen kaum ausgereifte HDL und zeigen somit in der Isotachophorese das für Tangier Patienten typische Lipidprofil. Weiter zeigen diese Zellen einen dilatierten Golgi mit vergrößerten trans-Golgi-Zisternen. Diese ultrastrukturelle beobachtbare abnormale Morphologie des Golgi-Apparates zeigen auch verschiedene Zelltypen der Tangier Patienten. [Orsó et al. (2000); Lawn et al. (1999)].

1.3.3. Pathobiochemie und Defekte in der Cholesterin Homöostase

Neben der Defizienz der reifen α -HDL ist der Gesamtcholesterinspiegel bei betroffenen Patienten deutlich reduziert, bei Homozygoten ergab sich ein Plasmacholesterin von $69 \pm 14 \text{ mg/dL}$. Die Phospholipidkonzentration beträgt zwischen 30 - 50% des normalen Spiegels [Shaklady et al. (1968) Trümbach (1997)]. Die LDL-Cholesterinkonzentration ist häufig erniedrigt, wobei die LDL-Partikel auf Kosten der Cholesterinester mit Triglyceriden angereichert sind. Diese veränderte Komposition ist Folge des verminderten Cholesterintransfers von HDL auf LDL und führt auch zu einem veränderten Bindungsverhalten der LDL [Kunitake et al (1990)]. Außer apoA-I und apoA-II ist die Gesamtkonzentration der anderen Apolipoproteine nicht verändert. Das apo A-I liegt bei Homozygoten bei 1% Gesamtgehalt (verglichen mit Kontrollen), wobei die Konzentration von apo A-II deutlich weniger reduziert ist [Assmann et al (1990)]. Die apo A-I-Precursor sind strukturell normal und die Synthese und Umwandlung zum Apolipoprotein verläuft ungestört. Das fast vollständige Fehlen der α -HDL kann somit nicht auf einen Defekt in den Apolipoproteinen A-I oder A-II zurückgeführt werden. Vielmehr liegt in Tangier ein beschleunigter Katabolismus von HDL und seiner Apolipoproteine vor [Schaefer et al. (1990); Zech et al. (1983); Bojanovski et al. (1987)]. Im Gegensatz zu normalen mononukleären Phagozyten (MNP), die HDL reseznieren und so zum reversen Cholesterintransport beitragen, binden und internalisieren Tangier MNP`s vermehrt HDL₃. Die HDL werden größtenteils lysosomal abgebaut und nur zum kleinen Teil reseznieren. Ein Prozeß, der durch die Cholesterinbeladung mit acetylierten LDL verstärkt wird [Robenek and Schmitz (1991)]. An kultivierten Tangier-Makrophagen wurde gezeigt, dass diese HDL von gesunden Probanden verstärkt binden, das

internalisierte HDL aber nicht mehr sezernieren, was zu einer Anreicherung dieser Lipoproteine in Makrophagen führt. Hinzu kommt, dass die anderen Lipoproteine verstärkt von diesen Makrophagen phagozytiert werden und so die Lipidanreicherung verstärken. Zudem zeigen Tangier-Makrophagen eine erhöhte Syntheserate für Triglyzeride und Cholesterinester sowie einen gesteigerten Auf- und Abbau von Phospholipiden. Somit findet eine Akkumulation von Cholesterinestern und Triglyzeriden statt. [Schmitz et al. (1985b), Schmitz et al. (1987), Schmitz et al. (1990), Herbert (1978)]. Bei ähnlichen Untersuchungen in Hautfibroblasten konnte eine erhöhte Konzentration an Cholesterinestern, Sphingomyelin (SPM) und Ceramid gefunden werden, die u.a. mit den Veränderungen im Zellzyklus zusammenhängen [Drobnik et al. 1999].

Die Aktivität der lipolytischen Enzyme (LCAT, Lipoproteinlipase und hepatische Triglyzeridlipase) ist nicht einheitlich verändert, es handelt sich um Sekundärveränderungen [Wang et al. (1987); Assmann et al. (1978); Pritchard et al. (1988)].

1.3.4. Gestörter Lipidefflux und gestörte Lipoprotein-induzierte Signaltransduktion

Um den zellulären Mechanismus der HDL-Defizienz näher zu charakterisieren, wurden in den letzten Jahren Untersuchungen zum HDL₃-induzierten Lipidefflux und zur HDL₃-vermittelten Signaltransduktion vorgenommen. Dabei konnte schon früh [Rogler (1995); Francis (1995); Remaley (1997)] eine Reduktion beim Cholesterin- als auch beim Phospholipidefflux in Tangier-Fibroblasten nachgewiesen werden. Nach Cholesterin-Beladung der Tangier-Fibroblasten wurde im Vergleich zu Kontroll-Zellen ein um 50% reduzierter HDL₃-vermittelter Cholesterin-Efflux beobachtet. Um diese Störung weiter zu differenzieren, wurde die Zellmembran mit Cholesterin markiert. Hierbei konnten keine Unterschiede im HDL₃-vermittelten Cholesterin-Efflux zwischen Tangier und der Kontrolle festgestellt werden. Nach Inkubation mit einem Sterol-Precursor lässt sich ein fast vollständiges Fehlen des HDL₃-vermittelten Efflux von Sterolen beobachten [Schmitz (1995)]. Allerdings ist der Efflux von LDL-Cholesterin in Tangier Zellen gleich dem der Kontroll-Zellen. Diese Untersuchungen zeigen, dass in Tangier-Fibroblasten der Efflux von neusynthetisiertem Cholesterin drastisch reduziert ist, während der Efflux aus LDL-Inkubation normal verläuft. Im Einklang damit stehen Experimente, wobei der Efflux mit unspezifischen Lipidakzeptoren wie Cyclodextrinen, welche die passive Diffusion von Cholesterin aus der Plasmamembran induzieren, ungestört abläuft [Francis et al. (1995); Remaley et al. (1997); Rogler et al. (1995); von Eckardstein et al.

(1998)]. Der spezifische Efflux von Cholesterin und Phospholipiden, der durch apo A-I induziert wird, ist hingegen stark reduziert. Eine Erklärung für die Reduktion des spezifischen Efflux neusynthetisierten Cholesterins könnte sein, dass in Tangier ein Defekt des Sterol-Transports vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Zellmembran vorliegt [Schmitz (1995)].

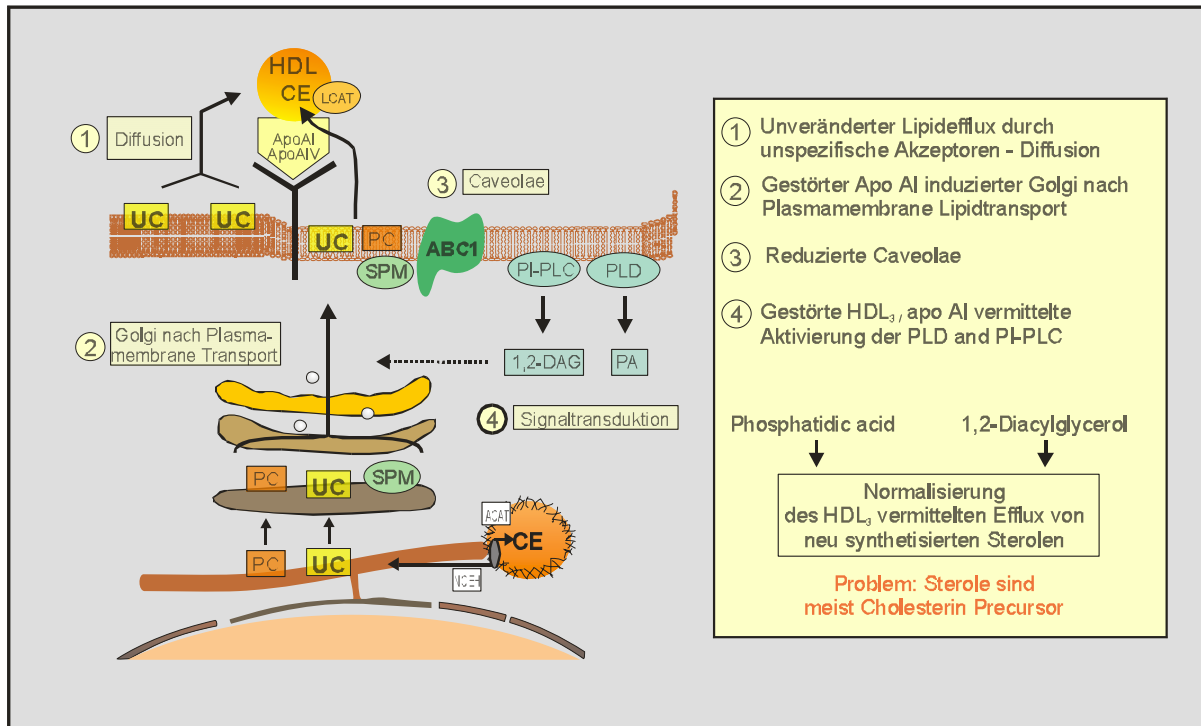


Abb. 5: Gestörter Lipid-Efflux in Tangier-Fibroblasten

Der reduzierte HDL₃-vermittelte Efflux kann durch einen zellpermeablen, kurzkettigen DAG-Analogon und durch 1,2-DAG selbst normalisiert werden [Rogler (1995); Trümbach (1997)]. Das veranlasste, neben den Untersuchungen zum Lipidefflux, auch Untersuchungen zur Lipoprotein-induzierten Signaltransduktion anzuschließen. Hierbei wurde festgestellt, dass nach Stimulation mit HDL₃ oder LDL die normalerweise aktivierte PI-PLC in Tangier eine Verminderung in der Entstehung ihrer Substrate (1,2 DAG und IP₃) zeigt. Als „second messenger“ setzen IP₃ und DAG Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei und aktivieren die Seronin/Threonin-spezifische Protein-Kinase C. Die nach Aktivierung stattfindende Translokation der PKC zur Plasmamembran konnte in Tangier-Zellen nicht gezeigt werden, was eine Folge der verminderten Ca²⁺-Freisetzung sein kann. Allerdings ist in Tangier die PKC basal mit einem höheren Anteil an der PM assoziiert [Drobnik et al. (1995); Nishizuka (1995)]. Weiter konnte in Tangier durch Walter et al. eine nach HDL₃-Induktion reduzierte PA-

Entstehung durch die PC-PLD beobachtet werden. Gleichzeitig wurde eine vermehrte DAG-Bildung durch eine PC-PLC gezeigt. Die Inkubation von Tangier-Fibroblasten mit Propanolol (steigert die zelluläre PA-Konzentration) kann den HDL-vermittelten Efflux weitgehend normalisieren, was auf eine Involvierung der PLD im Cholesterin-Efflux hinweist [Walter et al. (1996); Pappu and Hauser (1983)]. Die PLD ist zudem in der Regulation des Buddingprozesses am Golgi beteiligt. Offensichtlich ist in Tangier die Signaltransduktionskaskade, die zum Cholesterin-Efflux aus der Zelle zur PM führt, ein gestörter Prozess.

Neben den Abnormalitäten im Lipidstoffwechsel und der Signaltransduktion findet man in Tangier Fibroblasten auch morphologische Veränderungen. Diese zeigen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine vergrößerte Zelloberfläche und der Golgi liegt in dilatierter Form vor. *In vitro* weisen Tangier-Fibroblasten ein verzögertes Wachstum mit einem G2/M-Phasen-Arrest auf, was auf den erhöhten Ceramidgehalt der Zellen zurückzuführen ist [Drobnik 1999].

1.3.5. Tangier Erkrankung und Arteriosklerose

Wie erwähnt imponieren die Tangier Patienten mit stark erniedrigten apoA-I-Konzentrationen (3-5mg/dL) und Hypcholesterinämie (<120mg/dL) [Assmann et al. (1990b)]. Auch findet eine Cholesterinester-Akkumulation in den Tangier Makrophagen in verschiedenen Geweben statt. Wie schon beschrieben, konnte epidemiologisch gezeigt werden, dass die Hyperalphalipoproteinämie und der erhöhte Serumspiegel von HDL-Cholesterin mit Langlebigkeit einhergehen. Hier trifft die Hypothese zu, dass HDL eine protektive Wirkung hat. Umgekehrt findet sich, dass die erbliche Hypoalphalipoproteinämie mit einer Häufung sehr früh auftretender Gefäßerkrankungen korreliert [Frohlich et al. (1990)]. Allerdings gibt es Ausnahmen. So haben viele Tangier Patienten bemerkenswerterweise kein deutlich erhöhtes Arterioskleroserisiko. Das bedeutet, dass der HDL-Serumspiegel kein ausreichend sensibler Marker für solche Erkrankungen darstellt und legt die Vermutung nahe, dass die Erkrankung mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose durch eine zusätzliche Störung der HDL-Synthese verursacht wird. Es ergibt sich daraus die Frage, ob die antiatherogene Rolle der HDL ausreichend durch das reverse Cholesterintransportmodell erklärt ist, oder ob die epidemiologischen Befunde weiterer Interpretationen bedürfen. Diese kurze Erläuterung soll aufzeigen, aus welchem Grund die Tangier Erkrankung als Modellsystem in der Arteriosklerose-Forschung herangezogen werden kann, und warum hier in dieser Arbeit

vergleichende Untersuchungen zwischen Tangier und Kontrollzellen in der HDL-vermittelten Signaltransduktion vorgenommen wurden.

2. Aufgabenstellung

Die Cholesterinhomöostase wird im Wesentlichen durch die Cholesterinaufnahme und den Cholesterinefflux determiniert. Bekannt ist, dass die Plasma-HDL-Konzentration invers mit dem KHK-Risiko korreliert. HDL und Apolipoprotein A-I (ApoA-I) können Cholesterin aus der Zelle mobilisieren. Neben dieser Funktion werden den HDL noch weitere antiatherogene Funktionen zugesprochen. Die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und die nachfolgende Einwanderung der Zellen in den subendothelialen Raum stellt einen der frühen Schritte in der Arteriosklerose dar und spielt damit eine wichtige Rolle in der Atherogenese, so dass die Regulation der Migration dieser Zellen von besonderem Interesse erschien, und der Einfluss von HDL auf diesen Prozess charakterisiert werden sollte.

Die Interaktion von Monozyten mit Endothelzellen wird durch Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin vermittelt. Eine vermehrte Expression dieser Adhäsionsmoleküle findet sich in arteriosklerotischen Läsionen und kann durch HDL unterdrückt werden. Bekannt ist, dass HDL die Interaktion von Monozyten mit Endothelzellen verhindern kann. Neben den Effekten auf die Adhäsion besitzt HDL auch eine hemmende Wirkung auf die CCR-2 Expression und die MCP-1 induzierte Chemotaxis von THP-1 Zellen, einer humanen monozytären Zelllinie.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Be- und Entladung der Zellen mit Cholesterin auf die Migration, Chemotaxis und das M-CSF (Monozyte-Colony-Stimulating Factor) induzierte Spreading primärer humaner Monozyten von Normal Spendern und Spendern der Tangier-Erkrankung untersucht. Zugrunde liegt der Tangier-Erkrankung ein zellulärer Defekt der ABCA1 abhängigen pre- β -HDL-Prozessierung von ApoA-I enthaltenden HDL-Vorstufen zu prä- β -HDL. Dieser zelluläre Defekt ist besonders ausgeprägt bei Makrophagen und Thrombozyten und bildet die Grundlage der Splenomegalie (Makrophagen und Plättchen) und der Atherogenese (Makrophagen, Plättchen und Endothel), die diese Erkrankung kennzeichnen.

Zur Untersuchung der oben beschriebenen Prozesse und der Rolle der HDL bei diesen dient die Tangier-Erkrankung als Modell zur Charakterisierung zellulärer HDL-Effekte. Während dieser Arbeit wurde ABCA1 als zentraler Regulator des HDL-Stoffwechsels identifiziert. ABCA1 ist wesentlich am Export von Lipiden im Rahmen des apoA-I induzierten Lipidefflux involviert. Mutationen im ABCA1-Gen konnten als der genetische Defekt der Tangier-Erkrankung identifiziert werden. Somit spielt ABCA1 in der Atherogenese eine wichtige Rolle und es kann angenommen werden, dass ABCA1 in Makrophagen eine antiarteriosklerotische Funktion besitzt.

Diese Arbeit liefert Anhaltspunkte für die antiatherogene Rolle von HDL in der Arteriosklerose und der zugrunde liegenden zellulären Effekte. Zudem stellt sie einen Zusammenhang zwischen der antiatherogenen Funktion von ABCA-1 und der Tangier-Erkrankung her.

Zur weiteren Abklärung der Regulation dieser Mechanismen wurde der Einfluss der Cholesterin Be- und Entladung auf die Expression und Aktivität von CDC42 analysiert. Die funktionellen Untersuchungen wurden sowohl in Kontroll- als auch Tangierzellen durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Zubehör

Die verwendeten Geräte für die Gelelektrophoresen, wie z.B. elektrophoretische Apparaturen, Spannungsquellen und Semi Dry Transfer Blotter sind entweder von BioRad (Heidelberg), Pharmacia (München) oder LKB Bromma (Schweden). Die Zentrifugen und Ultrazentrifugen sind von den Firmen Heraeus (Hanau) oder Beckmann (München). Die Analysenwaagen von Satorius (Göttingen). Die UV-Spektrophotometer sind Geräte der Firmen Perkin Elmer. Des Weiteren werden die Geräte für die Zellkultur oder Analysengeräte und die dazu gehörigen Software-Programme bei den jeweiligen Methoden explizit deklariert.

3.1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a. Qualität und stammten, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Hofmann La Roche (Schweiz), Fluka (Deisenhofen) und Gibco BRL (Eggenstein) oder sind deklariert. Die Radiochemikalien werden von Amersham (Braunschweig) und Du Pont, NEN, (Bad Homgurg) bezogen.

Das verwendete entionisierte Wasser ($18\text{M}\Omega$) wurde von einer Wasserentsalzungsanlage Milli Q (Millipore, Bredford MA, USA) hergestellt. Im Folgenden wird dieses Wasser als H_2O bezeichnet.

3.1.3. Antikörper

Die verschiedenen Primärantikörper, die für die Western Blots verwendet werden, werden bezogen von: Becton Dickinson, Santa Cruz, Dianova und Pharmingen und sind im Einzelnen bei den dazugehörigen Ergebnisteilen deklariert. Die Sekundärantikörper sind, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Dianova und Santa Cruz und Peroxidase markiert.

Die Antikörper der Immunfluoreszenzfärbungen sind Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin, Peridin Chlorophyll oder Allophycocyanin gelabelt und werden später aufgelistet.

3.1.4. Oligonukleotide und Primersequenzen

Alle Oligonukleotide stammen von der Firma MWG-BIOTECH GmbH (Ebersberg).

Es werden hier die Primerbaare für die PCR zur Amplifizierung der DNA-Matrize der verschiedenen Gene aufgelistet.

Gen	Primer	Sondenlänge
CDC42	fw 5' TCAGCTACCCGCCTTCGTCT ³ rev 5' TAGCGCCTGGTGTGTCAGGT ³	907bp
IQGAP	fw 5' CACCTATCTGGCCAAGCTC ³ rev 5' GAGGTCGTCCAGCAGTTCGT ³	1045bp

3.1.5. Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur

Kulturmedien

- Dulbecco's modified Eagles Medium DMEM (Serva/Bio Whittaker, Heidelberg) mit 4.5 g/L Glutamin
- Makrophagen-SFM Medium (Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein)
- RPMI-Medium mit 4.5 g/L Glutamin (Biochrom KG, Berlin)

Zusätze

- Nichtessentielle Aminosäuren MEM (Life Technologies/Gibco BRL; Eggenstein), 5mL/500mL
- Penicillin und Streptomycin (Life Technologies/Gibco BRL; Eggenstein), 5mL/500mL
- Fötales Kälberserum FCS (PanSystems, Aidenbach); wenn nicht anders angegeben 10% (50mL/500mL)
- Rinderserumalbumin BSA (Sigma, 7.5% sterile Lösung in PBS)
- M-CSF, rekombinant, human (R&D Systems, Wiesbaden)

Puffer und andere Lösungen

- Dulbecco's phophat buffered saline PBS: steril mit und ohne Ca²⁺/Mg²⁺ als Fertiglösung und unsteril in Pulverform (Serva/Bio Whittaker, Heidelberg)
- Trypsin (0.5 g/L)/EDTA (0.2g/L) (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

Kulturgefäße

Für Fibroblasten:

- Gewebekulturflaschen 75 cm² Fläche, mit Filterkappe (Nunc, Wiesbaden)
- 12-Lochplatten: Multi Well Platten je 2.25 cm Ø, 4.0 cm² (Becton-Dickinson/Falcon, Heidelberg)

Für Monozyten/Makrophagen:

- Gewebekultur(Polystyren)-Petrischalen, 100x15 mm für 10 mL Medium (Falcon), für 10×10^6 Zelle/Schale
- PetriPerm-Schalen, hydrophobe Beschichtung, 50 mm \varnothing für 5 mL Medium (In vitro Systems and Services), für 5×10^6 Zellen/Schale
- ChamberSlides je $2 \times 2 \text{ cm}^2$ für 2mL Medium, für 2×10^5 Zellen

3.1.4. Patientengut (Tangier Erkrankung)

Patient 1 (TD3): weiblich, geb. 1930, Hautstanzen entnommen im Alter von 55 und 64 Jahren, Gesamtcholesterin 78-103 mg/dL; HDL-Cholesterin 3 mg/mL; Triglyceride 258-429 mg/dL, zusätzlich sind hier elutrierte Monozyten verfügbar, der APO-E-Polymorphismus ist: E3/E3.

Patient 2 (TD3): männlich, geb. 1933, Hautstanzen entnommen im Alter von 52 und 65 Jahren, Gesamtcholesterin 45-58 mg/dL; HDL-Cholesterin 3 mg/mL; Triglyceride 139-196 mg/dL, zusätzlich sind hier elutrierte Monozyten verfügbar, der APO-E-Polymorphismus ist: E3/E4.

Patient 3 (TD2): männlich, geb. 1957, Hautstanzen entnommen im Alter von 32 Jahren, Gesamtcholesterin 208 mg/dL; HDL-Cholesterin 3 mg/mL; Triglyceride 186 mg/dL, zusätzlich stehen hier elutrierte Monozyten zur Verfügung, E3/E3.

Patient 4 (TD1): männlich, Gesamtcholesterin 90 mg/dL HDL-Cholesterin 2 mg/mL; Triglyceride 304 mg/dL, der APO-E-Polymorphismus ist: E3/E3.

Patient 5 (TD4): männlich, Gesamtcholesterin 88 mg/dL HDL-Cholesterin 1 mg/mL; Triglyceride 570 mg/dL, der APO-E-Polymorphismus ist: E3/E3.

Patient 6 (TD4): männlich, Gesamtcholesterin 132 mg/dL HDL-Cholesterin 8 mg/mL; Triglyceride 169 mg/dL, der APO-E-Polymorphismus ist: E3/E3.

Zusätzlich standen Fibroblasten von 4 normolipidämischen Spendern sowie elutrierte Monozyten von verschiedenen gesunden Spendern zur Verfügung.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturtechniken

Alle Kultivierungsbedingungen fanden bei 37°C in einer wassergesättigten 10%CO₂-Atmosphäre statt in Zellkulturschränken von Heraeus (Hanau).

3.2.1.1. Kultivierung humaner Monozyten

Monozyten von Normalspendern wie auch von Patienten werden durch Leukapherese gewonnen. Zur Abtrennung der Monozyten von den anderen Leukozytenpopulationen wird die Gegenstromzentrifugation mittels eines Elutriators (Beckmann, JE-6B, J2-21 Kühlzentrifuge, 2040 rpm, 15°C) durchgeführt. Es werden Zellfraktionen mit steigender Flußrate und konstantem Druck gesammelt. Die einzelnen Fraktionen werden zentrifugiert, in einem geringen Volumen resuspendiert und durchflußzytometrisch auf Reinheit geprüft. Monozytenfraktionen mit einem Reinheitsgrad >90% werden gepoolt und die Zellzahl mittels eines automatischen Zellzahlgerätes bestimmt.

Je nach experimentellen Versuchsanforderungen werden die Zellen in Makrophagen-SFM-Medium mit 50ng/mL Medium mit verschiedenen biologisch aktiven Substanzen kultiviert. Während der fünf-siebtägigen Kultivierung im Brutschrank differenzieren die Monozyten in Makrophagen-ähnliche Zellen. Nach Versuchsprotokoll werden die Zellen an unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierungsdauer geerntet und verarbeitet.

3.2.1.2.. Kultivierung humaner Tumorzellen

Tumorzellen dienen in vielen experimentellen Ansätzen als Zellmodelle. Etablierte Tumorzelllinien wachsen schnell und sind für die Etablierung von Methoden oder zum Titrieren von Antikörpern gut geeignet. Hier werden die Tumorzellen für die Austitration von Antikörpern der FACS-Analyse verwendet. Und zum weiteren diente die U-937-Zelllinie für die Verifizierung der CDC42-Expression nach PMA-Stimulation.

THP-1 und U-937-Zellen

THP-1 und U-937 Zellen werden in RPMI-Medium mit 10% (v/v) FCS angezogen. Durch Zugabe von PMA (160nM) differenzieren die Tumorzellen in Makrophagen ähnliche Zellen, werden adhärent und zeigen die Eigenschaften humaner Makrophagen (u.a. gesteigerte Phagozytose, Makrophagen spezifische Oberflächenmarker).

3.2.1.3. Kultivierung humaner Hautfibroblasten

Von freiwilligen Spendern werden Hautstanzen entnommen, aus denen in DMEM mit 20% FCS Fibroblasten-Primärkulturen herangezogen werden können. Nach Bildung eines Monolayers werden die fest anhaftenden Zellen unter Einwirkung von Trypsin/EDTA abgelöst, gesplittet und bis zur erneuten Konfluenz in DMEM mit 10% FCS 5-10 Tage kultiviert. Zur Synchronisierung der Zellen in der G₁/G₀-Phase wird das FCS-haltige Medium durch DMEM mit 0,5% BSA ersetzt und die Zellen weitere 24h kultiviert. Die Fibroblasten werden zwischen den Passagen 3 bis 16 für die Experimente verwendet. Die Stimulation der Fibroblasten erfolgt nach der Synchronisation durch Zugabe von 100µg/mL HDL3 oder 10µg/mL ApoA-I für bis zu 24h. Für eine Aufbewahrung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C unter Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren.

3.2.2. Proteinchemische Methoden

3.2.2.1. Präparation von Proteinen aus biologischem Zellmaterial

3.2.2.1.1. Gesamtzellextraktion aus humanen Fibroblasten

Die Fibroblasten werden nach den jeweiligen Kultur- und Stimulationsbedingungen mit den Gewebekulturflaschen auf Eis gestellt und vom Medium befreit. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS werden die adherenten Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, USA) vom Boden gekratzt und in PBS aufgenommen. Durch Zentrifugieren für 10 min bei 1200 x g wird das Zellpellet gesammelt. Der PBS-Überstand wird abgesaugt und das Pellet in Puffer A (0.5 mL/Kulturflasche konfluenter Zellen) aufgenommen. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten wird das Pellet unter Eis zweimal für 30 sec. gesonifiziert. Zelldebris und die Nukleuli werden bei 800 x g für 5 min abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes zur Proteinbestimmung verwendet. Das Proteinhomogenat wird durch Zugabe von 72% TCA, im Verhältniss 10:1 gefällt, und nach 1h auf Eis durch Zentrifugieren in der Tischzentrifuge bei 13000 x g pelletiert. Das Zellpellet wird in 1x Lämmli-puffer aufgenommen und für mindestens 1h bei Raumtemperatur extrahiert. Zum vollständigen Denaturieren wird die Probe für 3 min bei 95°C erhitzt und ist zur Verwendung für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet.

Puffer A:	137mM NaCL	
	8.1mM Na ₂ HPO ₄	
	2.7mM KCL	pH7.5
	1.5mM KH ₂ PO ₄	
	2.5mM EDTA	
	1mM DTT	

Der Puffer wird für die weiteren Verwendungen in Aliquots bei –20°C eingefroren. Bei Verwendung werden 0.1mM PMSF und 1mM Benzamidin zugegeben. Ein Proteinase-Inhibitor-Cocktail wird frisch beigemischt: 10µg/mL Leupeptin, 10µg/mL Aprotinin.

3.2.2.1.2. Gesamtzellextraktion aus humanen Monozyten

Die Monozyten werden nach den jeweiligen Kultur- und Stimulationsbedingungen mit den Petrischalen auf Eis gestellt, das Medium wird mit den nicht adherenten Zellen gesammelt und nach Abkratzen der adherenten Zellen wird die Probe bei 2000g für 10min zentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden nach zweimaligem Waschen mit PBS in Puffer A aufgenommen und für den Zellaufbruch gesonifiziert. Das Zellhomogenat wird weiter verarbeitet wie schon unter 3.2.2.1. für die Fibroblasten beschrieben.

3.2.2.1.3. Trennung des Gesamtzellextrakt in Zytosol und Membranfraktion

Nach der Präparation des Gesamtzellextrakt wird die zytosolische Fraktion durch Zentrifugation bei 100.000 x g und 4°C für 1 h von der Gesamt-Membranfraktion getrennt. Der Überstand bildet dabei die cytosolische Fraktion. Die pelletierte Membranfraktion wird in Puffer A aufgenommen und das feste Pellet wird durch Sonifiern im Puffer resuspendiert. Von beiden Zellfraktionen wird der Proteingehalt bestimmt und weiter für die SDS-Page vorbereitet.

3.2.2.1.4. Subfraktionierung eines Zellhomogenats in angereicherte Lysosomale-, Plasma- und intrazelluläre-Membranfraktion

Für die Etablierung einer zellulären Subfraktionierung in gereinigte Kompartiment-Fraktionen (Plasmamembran, Lysosomen, ER, Golgi, Zytosol) stehen prinzipiell mehrere Methoden zur Verfügung. Eine der herkömmlichen Methoden ist Reinigung mittels der differentiellen Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei werden die Membranfraktionen aufgrund ihrer Dichte im Schwerfeld basierend auf Unterschiede im physikalischen Verhalten eingestellt. Dabei kommen verschiedene Gradienten wie z.B. Saccharose, Percoll, Ficoll oder auch ein zwei Phasen-Gradient zur Anwendung. Will man, wie in diesem Fall homogene Fraktionen nebeneinander in einer Präparation

aufarbeiten, treten mittels differentieller Dichtegradientenzentrifugation folgende Probleme auf: fließende Trennung der Subfraktionen, Gradient überladen, Detektion der Markerenzyme quantitativ nicht sensitiv genug, schlechte Reproduzierbarkeit. Legt man den Schwerpunkt auf die Reinigung einer Fraktion, so läßt sich durch wiederholte Zentrifugationsschritte eine ohne Kontamination angereicherte Fraktion isolieren. Oft werden die Dichtegradientenzentrifugationen zum Vorreinigen der Fraktionen verwendet, um später die Subfraktionen mit einer anderen Methode aufzureinigen. Bei diesen kombinierten Reinigungsmethoden kommen die Free-Flow oder die Isotachophorese als zweite Methodik zur Anwendung. Die Trennung kommt hier aufgrund von Ladungsunterschieden im elektrischen Feld der verschiedenen Kompartimente und Zellorganellen zu Stande.

Eine sehr elegante Methode zur subzellulären Reinigung ist die Immunpräzipitation mittels Magnet-Bead-Technik. Voraussetzung ist das Vorliegen einer homogenen Suspension und die Verfügbarkeit eines für die anzureichernde Fraktion spezifischen Antikörpers. Die magnetische Markierung erfolgt später indirekt durch Bead-gekoppelte Sekundärantikörper. Die Separation erfolgt anschließend durch das Einbringen in ein Hochgradientenmagnetfeld. Nach der Bindung an den Bead und die Separation des Antikörper-Antigen-Komplexes werden die gebundenen Proteine eluiert. Die Limitation dieser Technik für die subzelluläre Fraktionierung ist die nicht Verfügbarkeit geeigneter monoklonaler Antikörper. Es sollten vier Antikörper existieren, die spezifisch für PM, Lysosomen, Golgi und ER sind und zudem unterschiedlicher Antikörper-Subklassen angehören.

Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten bei der differentiellen Dichtegradientenzentrifugation aus Zellhomogenaten und der Limitation der Antikörper bei der Magnet-Bead-Technik, wird sich in dieser Arbeit für die Etablierung einer partiellen Reinigung in der Ultrazentrifuge entschieden. Dabei werden eine Lysosomale-, Plasma-, und intrazelluläre-Membranfraktion angereichert.

Die Grundlage dieser Subfraktionierung ist die Sedimentation der verschiedenen schweren Membranfraktionen. Nach dem Sammeln der Zellen in der Zentrifuge werden sie durch mehrmaliges Pottern im hypertonischen Saccharosepuffer aufgebrochen. Nach Abtrennung der Zelldebris u. Nuklei bei 425 rpm für 5 min, wird die lysosomale Fraktion bei 15.000 rpm für 10min pelletiert. Die Plasmamembranfraktion wird bei 36.000 rpm für 30 min angereichert. Letztlich wird das Zytosol als Überstand durch Sedimentation der intrazellulären Fraktion bei 80.000 rpm für 1h erhalten. Die Pellets werden jeweils durch Sonifiern in Puffer A resuspendiert. Bis zu diesem Zeitpunkt wird auf Eis oder bei 4°C gearbeitet. Es liegen 5 Zellfraktionen vor, die auf die

Die Probe wird zum Substratpuffer ohne AMP gegeben und die Enzymreaktion gestartet durch Zugabe von AMP. Nach 30minütiger Inkubation bei 37° wird die

Reaktion durch PCA gestoppt, das präzipitierte Protein wird abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes zur kolorimetrischen Phosphatbestimmung verwendet.

- Enzymassay für Thiaminpyrophosphatase (Marker für Golgi)

Substratpuffer:	50 mM Na-Barbital	pH 9
	10 mM Barbital	
	15 mM CaCl ₂	
	3,3 mM Thiaminpyrophosphat	

Die Probe wird zur Vermessung der Golgi-Aktivität mit Substratpuffer auf 3 ml aufgefüllt und die Enzymaktivität gestartet. Nach 20minütiger Inkubation wird die Reaktion durch 1mL 10%TCA gestoppt, präzipitiertes Protein abzentrifugiert und der Überstand zur kolorimetrischen Phosphatbestimmung verwendet.

- Phosphatbestimmung:

Die Phosphatbestimmung wird in Anlehnung an das Protokoll von Friske et al., 1952 spektrophotometrisch vermessen. Die Enzymaktivitäten werden über die Freisetzung des Phosphats während der Katalyse bestimmt.

0-500µL Eichlösung (0-0,75µmol Phosphat) bzw. 500µL Probe werden mit 6% PCA auf 4mL verdünnt, mit 1,5mL Ammoniummolybdatlösung (0.6% (w/v) in 6% PCA versetzt und geschüttelt. Nach Zugabe von 0.5mL 0.2% (w/v) Ascorbinsäure erneut schütteln und nach 60 min die Extinktion bei 720 nm vermessen.

3.2.2.1.5. Überprüfung der Reinheit in der Subfraktionierung mittels 5'-Nukleotidase

Als Leitenzyme wurden verwendet: für die Plasmamembran (PM) die 5'-Nukleotidase, für das ER die Glucose-6-Phosphatase, für die Golgi-Membran die Thiaminpyrophosphatase (IM), für die lysosomale Fraktion (Lys) die saure Phosphatase. Als Substrate dieser Enzyme wurden Phosphat-Derivate eingesetzt. Die Enzymaktivitäten wurden später über die Freisetzung des freien Phosphats während der Hydrolyse bestimmt. Die Konzentration des abgespalteten Phosphats wurde anhand einer Eichlösung (0-0.75mol Phosphat) bestimmt. Die Enzymaktivität kann als Aktivität bezogen auf die Proteinkonzentration in µg/mL oder als spezifische Aktivität bezogen auf die Proteinkonzentration in µg ausgedrückt werden. Im Weiteren wurden die spezifischen Enzymaktivitäten/µg Protein in Prozent auf die Gesamtaktivität der einzelnen Fraktionen dargestellt. Die Anreicherung des PM-Markers in den einzelnen Fraktionen wird als Reinigungs-Faktor herangezogen und im Folgenden dargestellt.

	Probe1		Probe2	
Fraktionen	Protein in μg	Phosphat in μmol	Protein in μg	Phosphat in μmol
Lys	432,1	0,041	320,0	0,029
PM	163,5	0,033	190,2	0,026
IM (Golgi)	220,5	0,013	340,5	0,013
Zytosol	1160,0	0,014	1680,0	0,014

Tab. 10: Einzeldaten für die Proteinkonzentration und des abgespalteten Phosphats während der Hydrolyse der 5'-Nukleotidase innerhalb der verschiedenen Subfraktionen.

Diese Einzeldaten dienten zur Berechnung der spezifischen Aktivität in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ und der spez. Aktivität in % bezogen auf die Gesamtaktivität der Einzelfraktionen. Bei dieser Berechnung in % der Gesamtaktivität wurde ein `Cut off` von $< 0,015$ festgelegt.

	Probe1		Probe2	
Fraktionen	spez. Aktivität	spez. Aktivität in %	spez. Aktivität	spez. Aktivität in %
Lys	0,095	27,0	0,091	34,0
PM	0,20	56,0	0,14	52,0
IM (Golgi)	0,059	17,0	0,038	14,0
Zytosol	0,012	0,0	0,0083	0,0

Tab. 11: Daten für die spezifische Aktivität der 5'-Nukleotidase in $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$, umgerechnet auf die Gesamtaktivität in % der zellulären Subfraktionen.

Wie aus den Daten der Tabelle deutlich wird, lag zwischen der unabhängigen Proben ein Gleichverteilung der 5'-Nukleotidase-Aktivität innerhalb der einzelnen Subfraktionen vor. Deutlich wurde allerdings auch, dass die Plasmamembran-Verteilung nicht auf eine Fraktion beschränkt war. Die deklarierte PM-Fraktion beinhaltete den Hauptanteil dieser Aktivität und konnte somit als Plasmamembran angereicherte Fraktion beschrieben werden. Wichtig war, dass die intrazelluläre Membran-Fraktion, die vorwiegend den Golgi enthalten sollte, einen nur geringen Anteil dieser PM-Aktivität aufwies.

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen trennen. Die Proteine werden im Laemmli-puffer extrahiert, der das Detergenz Natriumdodecylsulfat enthält, wodurch die Eigenladung der Proteine maskiert wird, so dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Außerdem werden die Proteine aus der Assoziation mit anderer Proteine oder Lipide freigesetzt. Wenn unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wird, gibt man zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zu. Der entstehende Komplex aus denaturiertem Protein und SDS ist negativ geladen, so dass die Trennung in der Gelmatrix allein aufgrund des Molekulargewichtsunterschiedes zustande kommt. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine dem Logarithmus ihre Masse proportional. Durch mitlaufende Markerproteine bekannter Größe können den Proteinen Molekulargewichte zugeordnet werden. Die Porengröße der Matrix kann durch die unterschiedliche Konzentration von Acrylamid zu N,N'-Methylen-bis-Acrylamid (quervernetzend) bestimmt werden. Bei dem verwendeten diskontinuierlichen Gelsystem werden die Proben zunächst zur Fokussierung auf ein geringer vernetztes Obergel geladen und die Auftrennung erfolgt danach im höher konzentrierten Trenngel. Für ein Minigel (BioRad Mini Protean II) werden 10 mL Trenngellösung hergestellt und 10µL TEMED und 50µL 10% Ammoniumpersulfat werden zugesetzt, um die Polymerisation zu starten. Diese Lösung wird zwischen die Glasplatten pipettiert, mit H₂O überschichtet und zur Polymerisation mindestens 1h stehengelassen. Nach Entfernen des Wassers wird das Trenngel mit dem Obergel (5mL Obergellösung mit 10µL TEMED und 30µL 10% Ammoniumpersulfat versetzen), überschichtet, der gewünschte Probenkamm eingesteckt. Nach der vollständigen Polymerisation wird der Kamm entfernt. Die Gele werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammern mit Anoden und Kathodenpuffer gefüllt. Zuletzt werden die, wie unter 3.2.2.1. beschrieben, vorbereiteten Proben vorsichtig in die Probenkammern unterschichtet.

Laufbedingungen für Mini Gele: die Proben werden bei 35 V im Obergel fokussiert und zur Trennung der Proteine wird eine Spannung von 95 V angelegt. Erkennlich am Rainbowstandard kann je nach gewünschter Auftrennung der Lauf beendet werden.

Auswertung: die separierten Proteine können entweder durch Coomassie- oder durch Silberfärbung direkt sichtbar gemacht werden. Der spezifische Nachweis einzelner Proteine erfolgt mit Hilfe von Antikörpern nach Elektotransfer auf eine Membran (Western Blotting).

Acrylamid-Stammlösung (30%):	29.2g (29,2%) Acrylamid 0.8g (2,67%) N,N'-Methylen-bis-Acrylamid (BIS) ad 100mL mit aqua bidest auffüllen
Gelpuffer:	3M Tris/HCL pH 8.45 0.3% SDS
Ammoniumpersulfat AP(10%):	100mg Ammoniumpersulfat ad 1mL aqua bidest (frisch herstellen)
SDS-Probenpuffer(1x):	5.0g Sacccharose 1.0g SDS 0.5g 2-β-Mercaptoethanol (5%) 15.0mg Bromphenolblau mit 0.125 M Tris/HCL, pH 6.8 auf 50 mL auffüllen
Kathodenpuffer:	100mM Tris/HCL 100mM Tricine 0.1% SDS
Anodenpuffer:	200mM Tris/HCL pH8.9

3.2.2.3. Weitere Proteinchemische Methoden

3.2.2.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungen erfolgen nach der Methode von Bradford (M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)) mit einem Protein-Assay Konzentrat der Firma Biorad. Als Standard dient Rinderserumalbumin (BSA) in PBS. Es werden verschiedene Verdünnungen des Proteinstandards hergestellt von 1-50 µg/mL. Eine Standardkurve wird für jede Proteinbestimmung neu hergestellt. Für die Proben werden geeignete Verdünnungen hergestellt mit PBS. Alle Standards und die Proben werden mit PBS auf ein Volumen von 800µL verdünnt und in Einmalküvetten pipettiert. Zu diesen Verdünnungen werden 200µL Protein-Assay-Konzentrat dazugegeben, gut durchmischt und nach mindestens 5 min die Extinktion bei 595nm vermessen, mit dem Standard verglichen und rückgerechnet. Der Bio-Rad Protein Assay basiert auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Blue G-250-Lösung von 465 auf 595 wechselt, wenn diese an Proteine gebunden vorliegt. Der Farbstoff-Albumin-Komplex liefert über einen weiten Bereich von Proteinkonzentrationen eine lineare Abhängigkeit.

3.2.2.3.2. Proteinfärbungen

- Coomassie-Färbung (Burnette, 1981)

SDS-Polyacrylamidgele werden zuerst für 30 min. in Fixierlösung geschwenkt und für weitere 2h in der Färbelösung inkubiert. Man entfärbt die Gele wieder mit Entfärber, der mehrmals gewechselt wird. Die Proteine bilden blaue Banden. Zur Aufbewahrung und Dokumentation können die gefärbten Gele 2h bei 80°C im Gletrockner getrocknet werden. Kann mit der Coomassie-Färbung keine Detektion erreicht werden, können die Gele mit der Silberfärbung nachgefärbt werden. Da hier vorwiegend mit Zellhomogenaten gearbeitet wird, entfällt eine Silberfärbung.

Nachweisgrenze: 0.1 µg Protein

Fixierer und Entfärber:	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig
Färbelösung:	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig 0.1% (w/v) Coomassie Blue R 250

- Pouceau Rot Färbung

Mit dieser reversiblen Färbung können Proteine auf Blotmembranen sichtbar gemacht werden. Der Blot wird für eine Minute in der Färbelösung geschwenkt. Die Farbe kann mit H₂O wieder ausgewaschen werden.

Pouceau Rot-Färbelösung:	0.5 % Pouceau Rot 1% Eisessig ad 100mL mit aqua bidest
--------------------------	--

3.2.3. Immunologische Methoden

3.2.3.1. Western Blotting

Beim Western Blotting nach dem Semi-Dry-Verfahren (Towbin et al., 1979) werden die auf einer SDS-Page separierten Proteine durch Elektrotransfer auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran übertragen. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle sind für großmolekulare Liganden (z.B. Antikörper) frei zugänglich. Ein spezifischer Nachweis nach Blockierung unbesetzter Bindungsstellen ist möglich. Die spezifisch wechselwirkenden Antikörper werden durch Reaktion mit sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-IgG-Antikörpern durch Chemolumineszens nachgewiesen. Die hydrophobe Polyvinylidenfluorid FluoroTransmembran (Fa. Pall GMBH) wird kurz in Methanol getaucht und danach wie auch das SDS-Polyacrilamidgel in Transferpuffer für

10 min. äquilibriert. Als Pufferspeicher werden mehrere zugeschnittene Whatman-Papiere ebenfalls mit Puffer getränkt. Aus Filterpapier, Membran und Gel wird ein `Blot-Sandwich` zwischen Anode und Kathode zusammengebaut. Bei konstanter Stromstärke (0.8 mA/cm^2 Gel) werden die Gele in einem Blotter (Pharmacia) für 1-6h geblottet. Nach dem Blotvorgang kann die Membran mit Ponceaurot angefärbt werden, um die Proteine sichtbar zu machen, auch das geblottete Gel wird mit Coomassie nachgefärbt. Die Membran wird zur Vorbereitung auf die Antikörper-Detektion mit PBS+0.5% Milchpulver 2h oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Daran schließen sich drei 15-20 min. Waschschriffe mit PBS+0.1% Tween 20 an. Die Primär-Antikörper-Inkubation beträgt 1h bei RT in PBS+0.5% Milchpulver. Die Verdünnungen der Primär-Antikörper hängen von der Art des einzelnen Antikörpers ab. In den meisten Fällen gilt für polyklonale Antikörper eine 1:1000- und für monoklonale Antikörper eine 1:5000-Verdünnung. Anschließend wird der wie oben beschriebene Waschvorgang wiederholt. Die Sekundär-Antikörper-Inkubation beträgt 1h bei RT in PBS+0.5% Milchpulver und wieder schließt sich ein Waschvorgang an. Die Detektion von spezifisch gebundenen Antikörpern erfolgt durch Chemilumineszenz-Reaktion mit Peroxidase markierten Sekundär-Antikörpern. Der Nachweis mit dem ECL Western Blot Analysis System (Amersham) beruht auf der Peroxidase-katalysierten Oxidation eines zyklischen Diacylhydrazids (z.B.Luminol) im alkalischen Milieu unter gleichzeitiger Lichtemission bei 428 nm:



Die Anwesenheit eines „Enhancers“ (Phenol) im Reaktionsgemisch führt zu einer bis zu 1000-fachen Verstärkung der Lichtemission, die ihr Maximum nach 5-20min. erreicht. Die Nachweisreaktion wird durch Schütteln des Blots in einer Mischung von Reagens 1 und Reagens 2 im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Nach 1minütiger Inkubation wird der Blot zwischen Klarsichtfolien gelegt und mit dem Lumi-Imager (Roche Diagnostics) belichtet.

Transferpuffer:	48mM Tris/HCL	
	38mM Glycin	kontinuierlich
	0.0375 (w/v) SDS	
	20% Methanol	

3.2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung-Flow-Zytometrische Analyse

Die Flow-Zytometrischen Untersuchungen in dieser Arbeit werden zur Expressionsuntersuchung verschiedener Oberflächenantigene sowie intrazellulärer Proteine im Monozyten bzw. in vitro differenzierten Makrophagen verwendet. Die intrazellulären Messungen des CDC42-Proteins dienen zur Verifizierung der proteinchemisch erhobenen Daten. Die Methode der Flow-Zytometrischen Analyse

findet in dieser Promotionsarbeit keine Hauptanwendung, es soll allerdings ein Überblick über das Prinzip dieser Methode geliefert werden.

3.2.3.2.1. Prinzip eines Durchflußzytometers

Ein Durchflußzytometer stellt ein optisches Meßsystem dar, das Streulichtsignale und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Dadurch wird eine multiparametrische Analyse mehrerer physikalischer und biochemischer Eigenschaften einzelner Zellen ermöglicht.

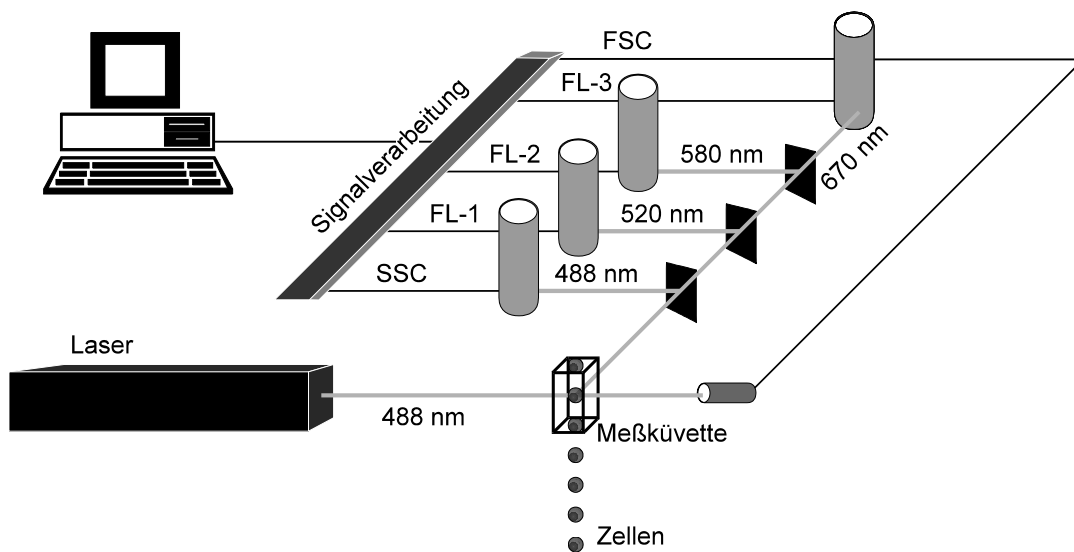


Abbildung 45: Schematischer Aufbau eines analytischen Durchflußzytometers mit Argonionenlaser zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe bei 488 nm

Der verwendete Durchflußzytometer ist ein Zwei-Laser-Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) mit einem Argonionenlaser, deren Emission bei 488 nm liegt und einem Diodenlaser mit einer 635 nm Anregungswellenlänge.

Eine Hüllstromflüssigkeit aus dem Vorratsbehälter wird kontinuierlich durch die Meßkammer in den Abfallbehälter gepumpt. Die Zellen werden vom Probenröhrchen in die Meßkammer über ein zweites Leitungssystem geleitet. In der Meßkammer vereinigen sich beide Flüssigkeitsströme. Im Zentrum der Meßküvette verengt sich der Flüssigkeitsstrom und erfährt eine Beschleunigung, so dass die Zellen als Einzelzellen den Meßpunkt, in dem der fokussierte Lichtstrahl auf die Zelle trifft, passieren.

Das optische System läßt sich in einen Anregungsteil und einem Detektionsteil untergliedern. Im Detektionsteil werden Streulichtsignale und Fluoreszenzsignale gemessen. Die Streuung des Laserlichtes wird durch zelluläre Eigenschaften, wie

Querschnittsfläche, Membranstruktur sowie Menge und Beschaffenheit intrazellulärer Granula und Vakuolen bestimmt.

Es werden zwei Streulichtsignale unterschieden: das Vorwärtstreulicht (Forward Angle Light Scatter, FSC) und das Seitwärtstreulicht (Side Scatter, SSC). Die Intensität des Vorwärtstreulichtes stellt ein indirektes Maß für die Querschnittsfläche des Meßobjektes dar und gibt somit Aufschluß über die Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht ist proportional zum Brechungsindex des Meßobjektes und enthält daher die Information über die Granularität der Zellen.

Neben den Streulichtsignalen werden zusätzlich drei bzw. vier Fluoreszenzsignale durchflußzytometrisch analysiert.

In der Mehrparameteranalyse werden fluoreszenzgekoppelte Antikörper mit folgenden Fluorochromen verwendet:

Fluorochrom	Abkürzung	Anregung	Detektion
Allophycocyanin	APC	635 nm	> 640 nm
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488 nm	530/30 nm
R-Phycoerythrin	PE	488 nm	585/42 nm
Peridinin Chlorophyll Protein	PerCP	488 nm	> 650 nm bzw. > 670 nm

Zur Analyse von toten Zellen, nach Isolierung oder Kultur werden diese mit Propidiumiodid gefärbt. PI wird wie PE angeregt und detektiert, wobei in Mehrfarbanalysen von fixierten Zellen nur FITC als weiteres Fluorochrom verwendet werden kann.

Die optischen Signale werden im Durchflußzytometer von Photodetektoren in elektrische Pulse, deren Höhe mit der Intensität des Lichtsignals korreliert, umgewandelt. Die elektrischen Signale des Streulichtes werden zusätzlich linear und die Fluoreszenzsignale logarithmisch verstärkt.

Die Geräteeinstellungen, Fluoreszenzkomensation, Verstärkung der Fluoreszenzsignale und Schwellenwerte werden im hiesigen Labor nach Standardeinstellungen für die Messung von isolierten Monozyten gewählt. Aufgrund der Vorwärtstreulicht- und Seitwärtstreulichteigenschaften kann eine definierte Monozytenregion (Monozytengate) detektiert werden.

Die Analyse der durchflußzytometrischen Messungen wird am FACSCalibur mit dem Programm CellQuest durchgeführt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Messung von Oberflächenmolekülen und verschiedene Protokolle zur Messung zytoplasmatischer Antigene. Bei Immunfluoreszenzfärbungen von Zelloberflächenantigenen ist eine direkte und indirekte Färbung möglich. Die indirekte Färbung kommt im Falle von nicht fluoreszenzgekoppelten Antikörper zur Anwendung. Hier sind die direkte Färbung von Oberflächenmolekülen und die intrazelluläre Färbung nach Jung et al. zur Anwendung gekommen. Vor Benutzung eines jeden Antikörpers wird eine Titrationskurve gefahren, um die optimale Antikörperkonzentration für das jeweilige Antigen und Protokoll zu bestimmen.

Die Proben werden nach den folgenden Protokollen vorbereitet:

3.2.3.2.2. Direkte Oberflächenfärbung

Hier wird die Färbung nach einem Standard-Protokoll mit gesättigten Antikörperkonzentrationen mit Fluochrome konjugierten monoclonalen Antikörpern {Stöhr, Schindler, et al. 1998 ID: 144} durchgeführt.

Die in hydrophoben Teflon-Schalen bis zu 5 Tagen kultivierten Monozyten werden je nach Versuchsprotokoll abgeerntet. Dazu werden die Teflon Schalen für mindestens 30min im Dunklen auf Eis gestellt, um die gegebenenfalls adherenten Zellen von der Beschichtung zu lösen. Die Zellen werden vorsichtig mit einem Zellschaber im Medium abgelöst und in Falcontubes überführt. Daraufhin werden sie zentrifugierend gesammelt bei 1200 rpm für 10 min. Das Medium wird vom Zellpellet abdekantiert und die Zellen in PBS+5% (w/v) BSA mit einer Zellkonzentration von 5×10^5 /Röhrchen resuspendiert. Pro Meßansatz und Polystyren-Röhrchen werden 500.000 Zellen verteilt und 100µL vorbereiteter Antikörper-Cocktail dazu pippettiert. Nach einer 30min. Inkubation auf Eis im Dunklen werden die Zellen mit PBS+BSA wiederholt zentrifugierend gewaschen (5min, 1500rpm). Beim letzten Waschschrift wird ein Minikus über dem Zellpellet stehengelassen, die Zellen resuspendiert und am FACSCalibur nach der Analyse von {Rothe, Gabriel, et al. 1996 ID: 143} vermessen. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper bei der direkten Oberflächenfärbung ist beigefügt.

Antikörper Konjugate	Klon	Quelle
CD16-FITC	3G8	Immunotech
CD49d-FITC	HP2/1	Immunotech
CD49e-FITC	SAM1	Immunotech
CD11a-FITC	25.3.1	Immunotech
CD11b-R-PE	D12	Becton-Dickinson
CD11c-R-PE	SHCL-3	Becton-Dickinson
CD36-R-PE	CB38(NL07)	Pharmingen
CD163-R-PE	GHI/61	Pharmingen

3.2.3.2.3. Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Hier wird nach dem Protokoll von Jung et al {Jung, Schauer, et al. 1993 ID: 259} vorgegangen. Nach Verteilung des Zellansatzes (100µL) werden die Zellen mit 600µL 4% Paraformaldehyd für 20min. auf Eis im Dunklen fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellen mit 4mL Permeabilisierungspuffer versetzt, gevortext und zentrifugierend bei 4°C für 5min. bei 1500rpm gesammelt. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit 20µL monoclonal CDC42-Antikörper (Klon B-8, Santa Cruz Inc., nach Titrationskurve) für 30min. auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen mit 4mL Permeabilisierungspuffer und nachfolgender Zentrifugation wird das Zellpellet mit 10µl gefärbtem Sekundärantikörper (FITC konjugiert Ziege Anti-Maus IgG, Becton-Dickinson) für weitere 30min. inkubiert. Nach dem letzten Waschgang mit PBS+BSA kann die Messung am FACSCalibur Flow Cytometer durchgeführt werden.

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

Um die Proteinanalysen zu verifizieren werden Northern Blots der spezifischen mRNA hybridisiert. Die Analyse der RNA mittels dieser Hybridisierungstechnik beinhaltet als molekularbiologische Techniken die Isolierung von Gesamt-RNA, Herstellung und Klonierung einer Sonde, Verifizierung der Klone mittels PCR, Sequenzierung der cDNA, Auftrennung von RNA und DNA in Agarosegelen, Extraktion der DNA aus Agarosegelen, Nukleinsäure-Transfer, Markierung von cDNA-Sonden und die

Hybridisierung und Darstellung mittels Autoradiographie. Diese einzelnen Methoden auf dem Weg zum Northern Blot sollen beschrieben werden.

3.2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA nach Chirwing et al. (Chirwing et al.)

Die als Einzelstrang vorliegende RNA ist extrem anfällig gegenüber dem Verdau durch RNAsen. Deshalb sollte sauber gearbeitet werden und alle verwendeten Lösungen und Geräte müssen RNAsen frei sein. Die Glaswaren werden ausgeglüht und Puffer und Lösungen werden vor Verwendung mit 0.1% (v/v) DEPC versetzt, inkubiert und autoklaviert. Die Isolierung der RNA basiert auf einer Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und in 3 mL GTC-Lösung lysiert. Adhärenente Zellen werden nach kurzer Einwirkzeit mit einem Zellschaber abgekratzt. Zum vollständigen Zellaufschluß wird die Suspension auf eine QIAshredder-Säule überführt und zentrifugierend das homogene Lysat gesammelt. In ein Polyallomer-Röhrchen (13x51mm, Beckmann) wird 1,2 mL CsCl-Lösung mit der GTC-Zellsuspension überschichtet. Die Auftrennung der RNA erfolgt anschließend im Dichtegradienten bei 36000 rpm, 20°C für 20h in der Ultrazentrifuge (Rotor SW55TI). Nach Dekantieren des Überstandes wird das RNA-Pellet in 300 µL DEPC-Wasser gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 33 µL 3M NaCl (1/9 Volumen) und 700µL Ethanol (2,3faches Volumen) wird die RNA bei -20°C 30min gefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 18000xg wird das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen bei RT in 50-100µL DEPC-Wasser aufgenommen. Anschließend kann die RNA zur Quantifizierung photometrisch vermessen und bei -80°C aufbewahrt werden.

GTC-Lösung (4M):	50g Guanidiumthiocyanant, 0.5g N-Laurylsarcosin Natriumsalz 2.5mL 1M Na-Citrat (pH 7), 0.7mL 2-Mercaptoethanol, ad 100mL DEPC-Wasser
CsCl-Lösung (5.7M):	95.97 CSCI, 20mL 0.5 M EDTA in DEPC-Wasser (pH 8.0), ad 100mL H2O bidest, DEPC behandeln, autoklavieren

3.2.4.2. Reverse Transkription der RNA

Um die nun isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, bedient man sich der AMV-Reverse Transkriptase (Promega). Bei dieser Reaktion wird mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern, die an das Poly(A)-3'-Ende der RNA hybridisieren, der cDNA-Strang in 5'-3'-Richtung synthetisiert, der komplementär zur RNA ist.

Standard-RT-Ansatz:	Gesamt-RNA (1µg)	xµL
	MgCl ₂ (25mM)	8µL
	Reverse Transkription Puffer (10x)	4µL
	rNasin Ribonuklease Inhibitor	4µL
	dTNP Mix (10mM)	1µL
	Oligo(dT)-Primer (0.5µg/µL)	1µL
	Reverse Transkriptase (23U/µL)	1.2µL

Der Reaktionsansatz wird 15 min bei 42°C inkubiert. Für eine nachfolgende PCR wird der Ansatz 5 min bei 95°C erhitzt und nachfolgend auf 4°C abgekühlt. Die Reverse Transkriptase wird inaktiviert und bindet nicht mehr an die entstandene cDNA.

3.2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nukleotidsequenzen werden in vitro enzymatisch durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Eingesetzt werden kann eine lineare oder zirkuläre DNA-Matrize, deren 5'-Ende und 3'-Ende bekannt ist, damit die Oligonukleotidprimer gewählt werden können. Die thermisch stabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) wird der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primer amplifiziert. Die PCR-Kettenreaktion setzt sich aus drei nacheinander folgenden Schritten zusammen: der Denaturierung, dem Annealing und der Extension. Während der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA-Matrizen bei 94°C getrennt, danach kommt es zur Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die jetzt einzelsträngige DNA. Bei der anschließenden Extension wird der DNA-Doppelstrang vom 3-Ende der Primer durch die DNA-Polymerasen bei 70°C synthetisiert. Diese Schritte werden in zahlreichen Zyklen alternierend durchlaufen. Der DNA-Abschnitt wird dabei exponentiell amplifiziert. Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgt noch eine 5minütige Inkubation, um die zuletzt synthetisierten DNA-Stränge fertigzustellen. Eine übliche PCR verläuft nach folgenden Zyklus-Parametern: 5min 94°C, 44sec 92,3°C; 40sec 60,8°C; 46sec 71,5°C (35 Zyklen), 5min 72°C. Ein PCR-Reaktionsansatz beinhaltet z.B. für eine RT-PCR die folgenden Komponenten: PCR-Puffer (10mM Tris-HCL, 50mM KCl (pH 8.3)), MgCl₂ (25mM), dTNP's (je 2,5mM), Oligonukleotidprimer1/2 (50mM), Matrizen-DNA (RT-Ansatz, 0.1µg/µL), Taq DNA-Polymerase (5 U/µL) und Wasser. Die PCR-Produkte werden im Anschluß mittels einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.4.4. Agarosegelsysteme

3.2.4.4.1. Auftrennung von DNA-in nativen Gelen

Auf Grund ihrer Mobilität wird DNA in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei sind die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats deprotoniert und die Doppelhelix erhält eine negative Gesamtladung, wodurch eine Wanderung im elektrischen Feld möglich ist. Die elektrische Mobilität verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenzahl. Die Prozentigkeit des Gels wird dabei der Größe des aufzutrennenden Fragments angepaßt. Zur Detektion wird die Agarose mit Ethidiumbromid versetzt, welches in die Doppelhelix interkaliert. Durch Anregung mit langwelligem UV-Licht (365nm) kann die DNA sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Die Agarose wird in TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und in eine Gelkammer gegossen. Nach Erkalten wird das Gel in einer Elektrophoresekammer mit den DNA-Proben bestückt (1/6 Volumen Probepuffer). Nach Abschluß der Elektrophorese können die DNA-Banden mit einem Lumi Imager (Roche) detektiert werden. Bei präoperativen Gelen können die DNA-Banden mit einem Skalpell aus der Gelmatrix herausgeschnitten und anschließend mit dem „QIAEX II Extraction Kit“ (Qiagen) gereinigt werden.

5xTBE-Puffer: 54g Tris, 27,5 g Borsäure, 20mL 0.5M EDTA (pH8), ad 1L H₂O

10xProbenpuffer: 100% Glycerin, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 0.1% (w/v) Xylen, 0.5M EDTA ad 10mL H₂O

3.2.4.4.2. Auftrennung von RNA in denaturierenden Gelen

Gesamt-RNA wird in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt, wobei das Formaldehyd eine Renaturierung der zuvor bei 56°C denaturierten RNA verhindert. Nach vollständigem Lösen der Agarose (1,2g in 62,3 mL) in der Mikrowelle und Abkühlen auf 60°C werden 5xLaufpuffer und 17,8 mL Formaldehyd (37% v/v) zugesetzt. Die zu analysierenden RNA-Proben werden in folgender Weise vorbereitet:

10-20 µg Gesamt-RNA	4,5µL
5 x Gellauf-Puffer	2,0µL
Formamid	10µL
Formaldehyd	3,5µl

Nach der Denaturierung (15 min, 56°C) werden die Proben mit RNA-Laufpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei 13 Volt über Nacht. Das Gel wird anschließend in Wasser geschwenkt und anschließend gefärbt (250mL H₂O +10µL

EtBr). Nach erneutem Wässern für 60 min in wechselndem H₂O wird das Gel mit angelegtem Lineal fotografiert.

5 x Gellauf-Puffer:	0.2 M MOPS	pH 7.0
	50mM Na-Acetat;	
	5mM EDTA	
10 x RNA-Probenpuffer:	50% (v/v) Glycerin	
	0.4% (w/v) Bromphenolblau	
	0.4% (w/v) Xylenyanol	
	1mM EDTA	

3.2.4.5. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente können durch quantitative Adsorption an speziellen Matrixes aus Agarosegelen isoliert und gereinigt werden. Mit Hilfe des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen können Ausbeuten von bis zu 90% erreicht werden. Dabei wird die DNA unter Hochsalz-Bedingungen an Silica-Gel gebunden und unter Niedrigsalz-Bedingungen (H₂O bidest oder TE-Puffer) eluiert. Das ausgeschnittene Agarosegelstück, welches die zu isolierende DNA trägt, wird zusammen mit 300µL Puffer QX1 pro 100mg Gel und 10µL QIAEX II-Suspension in ein Eppendorf-Cup überführt und 10 min bei 50°C im Heizblock unter Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugieren (18000xg, 2 min) wird das Pellet mit 500µL QX1-Puffer und 2x mit 500 µL PE-Puffer gewaschen. Das Pellet wird 10 min getrocknet und die DNA nach Zugabe von 20µL H₂O eluiert.

3.2.4.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.4.6.1. Enzymatische Spaltung von Plasmid DNA

Die Spaltung von DNA erfolgt mittels Restriktionsendonukleasen. In der Molekularbiologie kommen hauptsächlich Klasse II Endonukleasen zur Anwendung. Diese Enzyme besitzen eine palindromische Erkennungssequenz, deren Spaltung je nach Enzym überhängende Enden („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“) liefert. Dabei entstehen 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen. Der Restriktionsansatz kann analytisch oder präparativ durchgeführt werden. Die Inkubation erfolgt in den entsprechenden Puffern (Boehringer) für 2h bei entsprechender Temperatur im Wasserbad. Im Anschluß kann das Enzym bei 65°C denaturiert werden. Im analytischen Maßstab wird 1µg Plasmid-DNA mit 10 Units Restriktionsenzym in 20µL Gesamtvolumen.

3.2.4.6.2. Präparation von Insert-DNA („blunt end“-Klonierung von PCR-Produkten)

Für eine Ligation müssen die 5'-Enden der mit PCR generierten Insert-DNA mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert werden:

T4-DNA-Polymerase-Behandlung:	DNA-Fragment (PCR)	10µL
	5 x T4-DNA-Polymerase Puffer	10µL
	dNTP's (je 2.5mM)	10µL
	T4-DNA-Polymerase (10U/µL)	1.5µL
	H ₂ O	18.5µL

Dieser Ansatz wird 60 min bei 37°C inkubiert und die Insert-DNA mit dem „QIAEX II Kit“ gereinigt.

T4-Polynukleotidkinase-Behandlung:	DNA-Fragment	23.5µL
	10 x PNK-Puffer	3.0µl
	T4-PNK (10U/µL)	0.5µL
	ATP (10mM)	3.0µl

Die Reaktion erfolgt 60 min bei 37°C. Die Insert-DNA wird wieder gereinigt und für die Ligation vorbereitet.

5 x T4-DNA-Polymerase Puffer: 250mM Tris-HCL, pH 8.8, 5mM (NH₄)₂ SO₃, 35mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, 50mM 2-Mercaptoethanol, 0.1mg/mLBSA

10xPNK-Puffer: 500mM Tris-HCL, pH 8.2, 100mM MgCl₂, 50mM DTT, 1mM Spermidin, 1mM EDTA

3.2.4.6.3. Ligation

Die T4-DNA-Ligase verbindet in Gegenwart von ATP und Mg²⁺-Ionen DNA-Fragmente. Dabei wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Stranges und der 3'-OH-Gruppe des anderen Stranges kovalent verknüpft. Ein molares Mengenverhältnis von 1:3 bei Plasmid-DNA zu Insert-DNA hat sich als optimal erwiesen.

Reaktionsansatz:	Plasmid-DNA (200ng/µL)	2.0µL
	Insert-DNA (200ng/µL)	6.0µL
	5xLigase-Puffer	4.0µL
	T4-DNA-Ligase (5U/µL)	1.0µL

Die Ligation erfolgt bei 14°C über Nacht und wird direkt für die Transformation kompetenter E.coli-Zellen eingesetzt.

5xLigase-Puffer: 250mM Tris-HCL, pH 7.6, 50mM MgCl₂, 5mM ATP, 25% (w/v) PEG-8000

3.2.4.6.4. Transformation

Zur Transformation mit pUC-Plasmiden werden E.coli-Wirtsstämme verwendet, die keine aktive β -Galaktosidase synthetisieren können, weil sie eine chromosomale Deletion aufweisen. Als Folge dieser Deletion fehlen der mutante β -Galktosidase die Aminosäuren 11-41 des N-Terminus, die Nukleotidsequenz für den C-Terminus ist erhalten. Klonierungsplasmide der pUC-Serie kodieren die ersten 146 Aminosäuren der N-Terminus der β -Galaktosidase (α -Peptid). In dem für das α -Peptid kodierende Bereich des pUC-Plasmids befindet sich der Polylinker, der zu einer Insertion einiger AS in das α -Peptid, so dass das Leseraster erhalten bleibt. Nach Transformation von E.coli mit reiner pUC-DNA wird im Bakterium nun auch das α -Peptid synthetisiert. Als Folge aggregieren die beiden inaktiven Peptidketten zu aktiven β -Galktosidase. In Anwesenheit des Laktose-Analogons IPTG (Induktor) und des chromogenen β -Galaktosidase-Substrats X-Gal zeigen E.coli-Kolonien eine blaue Färbung. Das farblose X-Gal kann nun von der aktiven β -Galktosidase verstoffwechselt werden, wobei ein blau-gefärbtes Indigo-Derivat entsteht. Die Insertion von Fremd-DNA in den polylinker des pUC-Plasmids führt dagegen zur Inaktivierung des α -Peptid, die Kolonien bleiben weiß. Das Auftreten von blauen Kolonien ermöglicht eine Selektion der Klone mit rekombinanten Plasmiden. Plasmide, die dieses Screening nicht erlauben, können aufgrund der Plasmid-kodierten Antibiotika-Resistenz selektioniert werden. Die bei -80°C lagernden kompetente Bakterienzellen werden auf Eis aufgetaut. Ein 200 μL -Aliquot dieser Kultur werden mit 20 μL Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Ein nachfolgender Hitzeschock (90 sec., 42°C) verursacht, dass die Zellen die Plasmid-DNA aufnehmen. Nach weiterer 5minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen mit 1mL SOC-Medium versetzt und 1h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die Zellen erholen sich hierbei von der Transformationsprozedur und wachsen ohne Selektionsdruck an, anschließend werden sie auf Antibiotika-Selektionsplatten ausplattiert. Die ausplattierten Zellen werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

LB-Agar-Amp-IPTG-X-Gal:	1L LB-Medium mit 1.5% (w/v) Agar, autoklaviert, auf 55°C abgekühlt, mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin, 1mL X-Gal (20mg/mL in DMF), 0.2mL 100mM IPTG versetzt
-------------------------	--

3.2.4.6.5. Analyse der Transformanden

Hier stehen zwei Identifizierungs-Möglichkeiten positiver Transformanden mit rekombinanten Plasmid zur Auswahl. Einerseits kann eine Plasmidpräparation mit anschließender analytischer Restriktionsanalyse und andererseits eine PCR-Amplifizierung durchgeführt werden. Hierzu werden Einzelkolonien auf eine Agarplatte ausgestrichen und der Rest in ein mit Reakitonsansatz vorgelegtes PCR-Cup überführt. Die PCR-Primer sollten zum einen in der Plasmidsequenz und zum anderen in der Insert-Sequenz liegen.

3.2.4.7. Fluoreszenzsequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgt nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Ausgangsmaterial für die Sequenzierungsreaktion ist einzelsträngige DNA, die bei Plasmiden durch Denaturierung erhalten wird. Die T7-DNA-Polymerase synthetisiert nach Anlagerung der Sequenzierungsprimer den Komplementärstrang. Die Polymerase akzeptiert als Substrate sowohl dNTPs als auch ddNTPs. Es kommt zum Kettenabbruch, wenn in den wachsenden Strang ein ddNTP eingebaut wird. Es werden vier verschiedene Reaktionsansätze gewählt, die jeweils eines der vier ddNTP's (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) enthalten. Es kommt zu einer statistischen Verteilung aller Fragmentlängen.

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wird mit dem „ALFexpress™AutoRead™ Sequencing Kit“ (PharmaciaBiotech) durchgeführt. Die entstehenden DNA-Fragmente werden durch Sequenzierungsprimer, die als Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide vorliegen detektiert. Alternativ kann die Markierung der DNA-Fragmente durch den Einbau von Fluoreszenz-markiertem Cy5-aATP (ALFexpress™ dATP Labelling Mix) erfolgen. Der „ALFexpress DNA Sequencer“ (Pharmacia, Freiburg) regt diese Fluoreszenzmarkierung durch Laserlicht an und detektiert das emittierte Lichtsignal, sobald ein markiertes DNA-Fragment den Laserstrahl und die dahinterliegende Detektionsleiste passiert. Der angeschlossene Computer verrechnet das Signal und die DNA-Sequenz wird als Kurve und Text ausgegeben. Die Sequenz kann gespeichert und mit entsprechenden Analysenprogrammen elektronisch verarbeitet werden.

3.2.4.7.1. Sequenzierungsreaktion

Die Plasmid-DNA einer Minipräparation dient als Matrize. Da hier die Sequenzierung zur Überprüfung der Insert-DNA, die später als Sonde für die Hybridisierung verwendet werden soll, dient, wird die Sequenzierung mit pUC18-spezifischen Fluoreszenz-

markierten Universal- und Reverse-Primer durchgeführt. Zunächst wird die Matrizen-DNA denaturiert.

PUC18-Plasmid-DNA (4-6µg)	10µL
Fluoreszenz-markierte Universal- oder Reverse-Primer (2.5 pmol/µL)	2.0µL
1 M NaOH	1.5µL

Dieser Ansatz wird bei 65°C für 5 min inkubiert, kurz zentrifugiert und erneut bei 37°C für 5 min inkubiert. Dabei kommt es zur alkalischen Trennung der Wasserstoffbrücken.

Im Weiteren wird das Annealing der Primer vorbereitet:

1 M HCL	1.5µL
Annealing-Puffer	2.0µL
DMSO	3.0µL

Der Ansatz wird gemischt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Danach erfolgt die Extensionsreaktion:

Extensionspuffer	1.0µL
T7-Polymerase	2.0µL

In einer Mikrotiterplatte werden jeweils 3µL der vier Didesoxynukleotid-Mixe vorgelegt und bei 37°C vorgewärmt. Von der Extensionsreaktion werden nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C jeweils 5µL-Aliquots zupipettiert, gut gemischt und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Sequenzierreaktion gibt man 5µL Stoplösung zu. Bevor die Reaktionsansätze auf das Sequenziergel aufgetragen werden, werden sie 3 min bei 85°C denaturiert. Auf das Gel werden pro Spur 5µL der Sequenzierreaktion aufgetragen.

ddA Termination Mix:	5µM ddATP, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dTTP, 1mM dGTP, 50mM NaCL, 40mM Tris-HCL, pH 7.6
ddC Termination Mix:	5µM ddCTP, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dTTP, 1mM dGTP, 50mM NaCL, 40mM Tris-HCL, pH 7.6
ddT Termination Mix:	5µM ddTTP, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dTTP, 1mM dGTP, 50mM NaCL, 40mM Tris-HCL, pH 7.6
ddG Termination Mix:	5µM ddGTP, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dTTP, 1mM dGTP, 50mM NaCL, 40mM Tris-HCL, pH 7.6
Annealing-Puffer:	1 M Tris-HCL, pH 7.6, 100 MgCL ₂
Extensions-Puffer:	304mM Zitronensäure, 324mM DTT, 40mM MgCL ₂ , pH 7.5
Stoplösung:	Formamid deionisiert, 5mg/mL Dextran Blau 2000
Enzymverdünnungspuffer:	20mM Tris-HCL, pH 7.5, 5mM DTT, 100 µg/mL BSA, 5% Glycerin

3.2.4.7.2. Sequenziergel

Das Sequenziergel ist ein denaturierendes Polyacrylamidgel, welches Harnstoff in hoher Konzentration enthält. Die bei der Sequenzierreaktion anfallenden DNA-Fragmente, welche sich um ein Nukleotid unterscheiden, werden mit diesem Gel aufgetrennt. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen, der Plattenabstand beträgt 0.5mm. Während der Elektrophorese wird das Gel auf 55°C temperiert.

Harnstoff	21.0g
Long Ranger(50%)	6.6mL
Wasser	20mL
Amberlite-Ionenaustauscher	3.0g

Der Harnstoff wird unter leichtem Erwärmen gelöst und das Gemisch durch eine 0.45µm Membran filtriert. Nach Zugabe von 9mL 10xTBE wird die Lösung mit Wasser auf 60mL gebracht und für ca. 20 min entgast. Durch Zugabe von 30mL TEMED und 300µL 10% Ammoniumpersulfat wird die Polymerisation gestartet. Mit Hilfe einer Spritze wird die Gellösung zwischen die Glasplatten appliziert und für 2h auspolymerisiert. Nach Einbau in den DNA-Sequencer und Erreichen 55°C Betriebstemperatur werden die Proben auf das Gel geladen. Der Lauf erfolgt bei 1500 Volt, 60mA mit 0.5x TBE Laufpuffer.

3.2.4.8. Radioaktive Markierung und Detektion von c-DNA-Sonden

DNA-Fragmente, einzelsträngig oder doppelsträngig, können sowohl radioaktiv als auch nichtradioaktiv markieren. Die Wahl der Methode hängt u.a. von der gewünschten Nachweisempfindlichkeit ab. Die nichtradioaktiven Markierungsvariationen mit z.B. Digoxigenin sind empfindlicher (Roche). Hier werden die c-DNA-Sonden alle radioaktiv markiert.

3.2.4.8.1. Radioaktive Markierung c-DNA-Sonden

Die Markierung von cDNA-Sonden erfolgt unter Anwendung des „Oligolabeling-Kit“ der Firma PharmaciaBiotech. Zunächst lagern sich Random-Hexamer-Oligonukleotide an die denaturierte DNA (Random-Priming). In einer Auffüllreaktion, katalysiert durch das Klenow-Enzym (E.coli), wird die einzelsträngige DNA zum Doppelstrang ergänzt. Dabei werden drei nicht radioaktiv-markierte dNTP's und ein in α -Stellung mit [P^{32}]-markiertes dNTP (dCTP) eingebaut, wodurch die neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert wird.

Reaktionsansatz: 50ng DNA
 24.0µL H₂O

Die DNA wird 10min bei 95°C denaturiert und 3min. auf Eis abgekühlt. Folgende Komponenten werden anschließend dazu gegeben:

10µL 5xReagenz-Mix
5µl α -[P³²]-dCTP (10µCi/µL)
1µL Klenow-Enzym (10 U/µL)

Die freien Nukleotide werden nach 60minütiger Inkubation bei 37°C abgetrennt und die α -[P³²]-Einbaurate bestimmt. Nicht eingebaute Nukleotide werden nach dem Größenausschlußverfahren durch Push Column- Gelfiltrationssäulen (Stratagen) von der markierten DNA-Sonde abgetrennt. Auf die äquilibrierte Säule (STE-Puffer) wird der mit 50µL STE-Puffer verdünnte Reaktionsansatz appliziert und mit 100mL nacheluiert. Vor und nach der Reinigung über die „Push Colum“ werden 1µL des Reaktionsansatzes entnommen und im Szintillationszähler vermessen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung läßt sich die Einbaurate bestimmen. Eine erfolgreiche Reaktion liefert einen Einbau von 30-80% der eingesetzten Radiokativität.

Reaktionsansatz 5x: 100µM dATP, 100µM dGTP, 100µM dTTP, 50mM Tris-HCL (pH 7.5), 50mM MgCL₂, 25mM DTT, 25U/mL Random Hexadeoxyribonukleotide, 250mM NaCL
STE-Puffer: 100mM NaCL, 20mM Tris-HCL pH 7.5, 10mM EDTA

3.2.4.8.2. Northern Blotting

Die Übertragung von Makromolekülen wie DNA, RNA oder auch Protein auf eine feste Matrix (Membran) bezeichnet man als Blotting. Diese Technik wurde das erstmals von E.M. Southern mit DNA durchgeführt. Der DNA-Transfer heißt daher Southern blotting. In Anlehnung an diese Bezeichnung heißen die analogen Techniken Northern und Western Blotting. Als Matrizen für den Transfer verwendet man in der Regel Nylonmembranen mit einer hohen Bindungskapazität.

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA läßt sich auf diese Membran transferieren und immobilisieren. Das Gel wird nach Färbung mit EtBr, der Dokumentation der 18S und 28S rRNA und anschließender Wässerung zum Blotten eingesetzt. Die Abschätzung der m-RNA-Länge ist aufgrund der sichtbaren ribosomalen RNA-Banden (18S und 28S rRNA) oder nach der Hybridisierung mit einer GAPDH-Sonde möglich. Die 18S rRNA ist mit einer Länge von 1,8 bis 2,0kb und die 28S rRNA mit einer Länge von 4,6 bis 5,2 kb in der Literatur beschrieben, die Auftrennung erfolgt mit einer linearen Abhängigkeit. Die Länge der in allen Zellen konstitutiv exprimierten GAPDH-mRNA beträgt 1,2 kb.

Als Blotgefäß kann eine Plastikwanne verwendet werden, die mit 20xSSC gefüllt ist. Auf einen Schwamm werden Whatman-Papiere gelegt und darauf das Agarosegel. Die mit 20x SSC äquilibrierte Nylonmembran wird auf das Gel gelegt, wonach wieder mit 20x SSC befeuchtete Whatman Papiere folgen. Zum Schluß wird der Blotaufbau mit einem Stapel trockenen Whatman Papieren und einer Glasplatte abgedeckt und mit einem 500g Gewicht beschwert. Aufgrund der wirkenden Kapillarkräfte wird die SSC-Lösung nach oben gesaugt und die Nukleinsäuren auf die Membran übertragen. Nach ca. 20h wird der Blot in umgekehrter Reihenfolge abgebaut, die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt und die transferierte RNA mittels UV-Crosslinking auf der Membran fixiert.

20x SSC-Stammlösung: 0.3M Na-Zitrat, 3m NaCL (pH 7.0)

3.2.4.8.3. Hybridisierung

Unter definierten Salz- und Temperaturbedingungen bilden sich zwischen einer markierten DNA-Sonde und dem komplementären Bereich der fixierten RNA stabile Hybriden. Unvollständige Hybride und unspezifische Bindungen können durch Waschschriffe entfernt werden. Kritisch bei der Hybridisierung ist die Temperatur, sie beträgt bei cDNA-Sonden in der Regel 65°C und berechnet sich nach der Formel $T_m - 5^\circ\text{C}$. T_m ist die Schmelztemperatur, bei der definitionsgemäß die Hälfte der basengepaarten Nukleinsäuren-Moleküle in Einzelstränge dissoziiert ist.

Die Membran wird zunächst in 20-50mL Hybridisierungslösung für 60 min bei 65°C vorhybridisiert. Im Anschluß wird die Membran in ein geringes Volumen frischer, vorgewärmter Hybridisierungslösung, die die zuvor bei 95°C denaturierten cDNA-Sonde enthält, überführt. Die Hybridisierung verläuft ü.N. bei 65°C unter leichtem Schwenken. Nach der Hybridisierung wird die Membran 5 min bei RT mit 5% (w/v) SDS in 1xSSC und anschließend 30 min bei 60°C in der gleichen Waschlösung gewaschen. Die Membran wird in Folie gepackt und eine Autoradiographie durchgeführt. Die Membran kann nach Entfernung der Sonde neu hybridisiert werden.

3.2.4.8.4. Autoradiographie

Die Detektion der Hybridisierung erfolgt mittels Röntgenfilmen. Dazu verwendet man lichtdichte Filmkassetten und lagert das Autoradiogramm bei einer Temperatur von -80°C. Nach entsprechender Expositionszeit sind die radioaktiven Signale nach Entwicklung des Filmes sichtbar.

3.2.4.9. Sonstige molekularbiologische Methoden

3.2.4.9.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-tragenden Bakterien werden im Selektionsmedium bis zu einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/mL Medium angezogen. Für die Ausbeute der Plasmid-DNA hat ihre Kopienzahl/Zelle eine entscheidende Rolle. PUC18 z.B. tragen das pMB1-Replikon und „High-copy-Plasmide“. Durch Mutation kann diese Bakterienzelle eine Kopienzahl von 300-700 Kopien produzieren. Die Plasmid-DNA kann in verschiedenem Maßstab isoliert werden, exemplarisch wird hier die Minipräparation von Plasmiden beschrieben, die eine Ausbeute von ca. 20µg zuläßt. Dazu wird der „Quiagen-Plasmid-kit verwendet. Die Bakterien einer 5mL ÜN-Kultur werden durch Zentrifugation (3000xg, 10min., 4°C) pelletiert und in 500µL Puffer P1 resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 500µL Puffer P2 hinzugegeben und bei RT für 5 min. inkubiert. Das im Puffer P2 enthaltene SDS denaturiert die zellulären Proteine, wobei die chromosomale und Plasmid-DNA im alkalischen Milieu denaturiert werden. Es ist darauf zu achten, dass die Suspension nur vorsichtig gemischt wird, da sonst die chromosomale DNA geschert wird, sich von der Zellmembran ablöst und mit der Plasmid-DNA vermischt. Durch Zugabe von 500µL eiskaltem Puffer P3 werden denaturierte Proteine, Zellmembranen, und daran anhaftende chromosomale DNA präzipitiert. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 18000xg wird der klare Überstand auf die „Quiagen“-Säule apliziert und mit Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt mit 800µL Puffer QF. Die eluierte DNA wird durch Zugabe von 560µL Isopropanol gefällt mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung bei RT in 20µL Wasser aufgenommen.

Puffer P1: 100µg RNase A, 50mM Tris-HCL, 10mM EDTA, pH 8.0

Puffer P2: 200mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3M K-Acetat, pH 5.5

Puffer QC: 750mM NaCL, 50mM MOPS, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100, pH 7.0

Puffer QF: 1.25 M NaCL, 50mM Tris-HCL, 15% Ethanol, pH8.5

3.2.4.9.2. Kultivierung von Bakterien (E.coli)

E.coli-Bakterien können auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium-Flüssigkulturen kultiviert werden. Eine Bakterienkolonie wird entweder mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen oder in einer Flüssigkultur angeimpft. Die Agarplatten werden bei 37°C im Brutschrank ü.N. inkubiert und die Flüssigkultur bei 250rpm ü.N. geschüttelt. Da die E.coli Kulturen meist zur Isolierung von Plasmiden verwendet werden, werden sie im

Selektionsmedium (Kulturmedium+Antibiotikum) angezogen. Das pUC18-plasmid z.B. enthält das lba-Gen, das für das Ampicillin-spaltende Enzym β -Lactamase kodiert. Der Zusatz von Ampicillin bewirkt, dass nur die e.coli-Zellen überleben, die Träger des bla-Gens sind.

Für eine dauerhafte Konservierung von E.coli-Kulturen werden Glycerinkulturen angelegt. 500 μ L einer stationären Flüssigkultur werden mit 500 μ L sterilem Glycerin (30%, v/v) gemischt und unter flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wird ein Aliquot der Glycerinkultur im LB-Medium angeimpft.

LB-Medium: 25g Luria Broth Base; ad 1000mL H₂O; autoklaviert

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar; autoklaviert

LB-Amp: LB (Medium oder Agar) abkühlen auf 55°C mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin versetzen

3.2.5. In vitro-Uptake von Antisense-Oligonukleotiden

3.2.5.1. In vitro-Uptake von Antisense-und Random-Oligonukleotiden

Um funktionelle Untersuchungen eines Proteins vorzunehmen, ist die Inhibition des Proteins erwünscht. Die spezifische Inhibition eines Proteins kann durch stabile oder transiente Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden erreicht werden. Aber auch durch Stimulation von Zellen mit spezifischen Toxinen kann gerade im Fall der Rho-Proteine eine Inhibition erreicht werden. Diese speziellen, inhibierenden Toxine (C3-Exoenzym, Cholera Toxin B) sind nicht für ein Protein spezifisch, sondern können inhibierend auf weitere Mitglieder der Familie wirken. Eine Alternative bieten spezifische Antisense-Oligonukleotide von der Firma Biognostik (Göttingen). Die Antisense-Oligonukleotide sind entwickelt worden, um die Translation eines Proteins zu inhibieren. Diese Inhibition der Genexpression vollzieht sich auf m-RNA-Ebene. Die Oligos hybridisieren mit ihrer komplementären Sequenz, wobei Adenin mit Uracil bindet. Nicht homologe Sequenzen anderer Gene können keine stabilen Hybriden mit den Antisense-Oligos formen, um die Protein Translation zu inhibieren. Werden stabile Hybride gebildet, kommt es zum Kettenabbruch während der Translation am Ribosom. Das Prinzip der Antisense-Technik ist in Abb. 46 dargestellt.

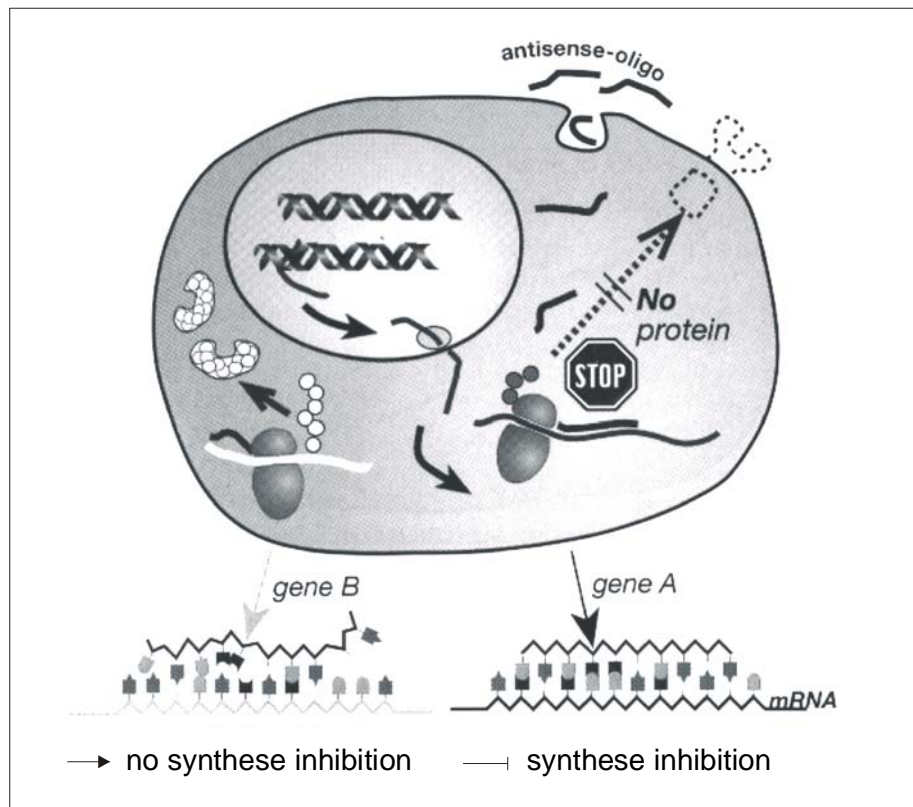


Abb. 46 Funktionelles Prinzip der Antisense-Oligonukleotide. Die Oligos binden im Zytoplasma an die spezifische mRNA. Bei einem 'Mismatch' mit anderen nicht homologen Sequenzen, kommt es nicht zur Ausbildung stabiler Hybride, die Proteinsynthese erfolgt. Die Ausbildung von stabilen Hybriden führt zur Inhibition der Proteinsynthese.

Die Oligonukleotide werden direkt ins Medium gegeben und von den Zellen über die Plasmamembran aufgenommen. Die lyophilisierten Oligonukleotide werden in 1x TE-Puffer (pH = 7.5) zu einer 100µM Stammlösung aufgelöst.

Bei den Spreading-Assays wird durch Austitration der AS- und Randomoligonukleotide eine optimale Wirkung-Dosis-abhängige Konzentration von 1µM/mL Medium ermittelt.

Die Modulation des Cholesterin-Efflux erfolgt in einem Konzentrationsbereich von 0.5µM-4µM/mL Medium.

Zur Kontrolle der spezifischen Aufnahme der CDC42-Antisense Oligonukleotide werden in vitro-Uptake Experimente mit FITC-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Auf dem Fluoreszenz-Image ist die intrazelluläre Lokalisation der Oligonukleotide zu erkennen.

3.2.5.2. In vitro-Fluoreszenz-Uptake von Antisense-Oligonukleotiden

Nach folgendem Protokoll wird beim in vitro Fluoreszenz-Uptake gearbeitet. Die Zellen werden auf einem 16-Loch-Glass-Kultur-Objekträger kultiviert. Für Fibroblasten gilt eine Zellzahl von 2000 Zellen/150µL Medium. Für Monozyten gilt eine Zellzahl von 5000 Zellen/150µL Medium. Die Fibroblasten werden zuvor trypsinisiert und nach Aussaat können die Zellen auf den Glasslides für 1h adherieren. Später werden sowohl Fibroblasten als auch Monozyten mit 2µM FITC-gelabelten Antisense-Oligos stimuliert und für verschieden lange Zeitpunkte kultiviert. Nach 4h, 8h, 24h und 48h werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für 5min fixiert. Nach zweimaligem Waschen wird das Präparat in einer Alkoholserie (70%-100%) dehydratisiert. Nach dem Lufttrocknen kann der Fluoreszenz-Uptake im Fluoreszenz-Mikroskop (Fluoreszenzmikroskop, Leitz BmgH, Wetzlar) bei einer 40x Vergrößerung mit Immersionsöl dokumentiert werden.

3.2.6. Funktionelle Assays

3.2.6.1. Protein Interaktions-Technik Pull Down-Assay

3.2.6.1.1. Präparation eines GST-Fusionsproteins

Um die Proteinexpressionsuntersuchungen bezüglich des CDC42-Proteins zu verifizieren, war es notwendig den GTP-gebundenen intrazellulären Pool dieses Proteins zu quantifizieren. Das GTP-gebundene Protein stellt die funktionell aktive Form dar. Nach Kontakt mit Arbeitsgruppe um Dr. J.G. Collard aus Amsterdam {Geijssen, van Delft, et al. 1999 ID: 292}{Sander, van Delft, et al. 1998 ID: 293} wurde mir freundlicherweise das Plasmid geschickt, welches das Insert der CRIB-Bindungsdomäne von PAK1b (acc#AF071884) trägt. Dieses Plasmid generiert ein GST-Fusionsprotein, welches CDC42 und Rac nur in der GTP-gebundenen Form bindet. Das Fusionsprotein beinhaltet die Aminosäuren 56-141 des PAK1b-Proteins und besitzt eine Größe von 34kDa. Das Plasmid wurde über Standard-PCR generiert und zwischen der BamH1 und EcoR1-Schnittstelle inseriert in pGEXTK-Plasmid (Pharmacia). Zunächst wurde das Plasmid in E.coli Top10-Zellen transformiert, um die DNA zu vermehren. Nach Reinigung des Plasmids wurde eine Transformation in BL21-Zellen vorgenommen, um das Fusionsprotein zu exprimieren. Die Expression des GST-Proteins wurde im Western Blot mittels eines doppelt markierten GST-Antikörpers überprüft. Nach Wahl des Clons wurde dieser in einer 5mL-Ü.N.-Kultur angeimpft, um am nächsten Morgen die Proteinexpression mit IPTG zu induzieren. Dazu wurde die angewachsene Kultur in ein 50mL-Kolben überführt und für 1h im Brutschrank bei 37°C

geschüttelt. Nach dieser Zeit werden die Zellen mit 100mM IPTG stimuliert und zur Proteinexpression weitere 2h geschüttelt. Nach der Proteininduktion werden die Zellen zentrifugierend bei 4°C für 10min. bei 5000 rpm gesammelt. Die Zellen werden in Lyse-Puffer lysiert und für ca. 3min. gesonifiziert. Die Zelltrümmer werden abzentrifugiert, das Homogenat mit 50%-Glutathione-Sepharose-Slurry (Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und für 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Das Bead-Pellet wird 3x mit Lyse-Puffer gewaschen und mit `GST-Fish`-Puffer zu 50% Sepharose-Slurry resuspendiert.

Lyse-Puffer:	20% Saccharose, 10% Glycerin, 0.2 mM Na ₂ S ₂ O ₈ , 2 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 50 mM Tris	pH 8.0
--------------	--	--------

3.2.6.1.2. CDC42-Aktivitäts-Assay

Der Aktivitäts-Assay wird mit geringen Modifikationen nach dem Protokoll von Sander et al. durchgeführt {Sander, van Delft, et al. 1998 ID: 293}{Sander, ten Klooster, et al. 1999 ID: 296}. Das an Sepharose-Glutathione-Beads gekoppelte GST-Fusionsprotein (siehe oben), wird benutzt, um CDC42 in der GTP-bebundenen Form aus Monozyten-Zellysaten zu präzipitieren. Für jede Messung werden 2×10^7 Monozyten zentrifugierend gesammelt, mit PBS gewaschen und in 1mL Puffer A aufgenommen. Die Zellen werden gesonifiziert, zentrifugiert und der Überstand weiter verarbeitet. Vom Zellhomogenat wird ein Aliquot zur Proteinbestimmung benutzt und Proben mit gleicher Proteinkonzentration mit doppelt konzentriertem `GST-Fish buffer` 1:1 verdünnt. Die zuvor präparierten Glutathione-Sepharose-Beads, die mit dem GST-Fusionsprotein gekoppelt sind, werden in gleichen Teilen zum Zellhomogenat dazu pipetiert. Diese Suspension wird für 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Später wird die Suspension mit 1x GST-Puffer dreimal gewaschen. Die gewaschenen Beads der Proben werden in 20µL Laemmli-Puffer aufgenommen, 1h resuspendiert und für 3min. bei 95°C gekocht. Die Proteinproben werden durch die SDS-Page aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Die Membranen werden mit dem monoclonalen CDC42-Antikörper entwickelt und mit dem Lumi-Imager quantifiziert.

1x GST-Puffer:	10% Glycerin, 100nM NaCL, 1% NP-40, 2mM MgCl ₂ , 50mM Tris (in der Gegenwart von Proteinase Inhibitoren)	pH 7.4,
----------------	---	---------

3.2.6.2. Spreading-Assay

Die auf Permanox-Slides und mit verschiedenen Agonisten kultivierten Monozyten werden nach der jeweiligen Inkubationsdauer nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen lassen sich mit der sogenannten May-Grünwald/Giemsa-Färbung anfärben und Licht-mikroskopisch auswerten. Es werden Zweiloch Permanox-beschichtete Schalen verwendet und pro Loch 100.000 Zellen ausgesät. Das Zeiss-Mikroskop ist mit einem 63x Objektiv und mit einem 2.4x3.6mm Fadenkreuz ausgestattet. Es werden ca. 200 Zellen/Kulturansatz ausgezählt und auf ihre zelluläre Morphology überprüft. Das Spreading Verhalten der Monozyten wird an Hand der folgenden Klassifizierung quantifiziert: 1. runde, adherente Zellen mit einem granulären Cytoplasma, 2. Zellen mit konzentrischem Spreading, welche ein diffuses, homogenes Cytoplasma aufweisen und die Plasmamembran durch ein minimales 'Ruffling' ausgezeichnet ist, 3. Zellen, die ein Spreading mit kurzen Filopodien zeigen und 4. Zellen, die ein deutliches Spreading mit langen Filopodien-Auswüchsen zeigen. Die Zellen der ersten und zweiten Kategorie werden als runde, adherente Zellen zusammengefaßt. Die Zellen der dritten und vierten Kategorie werden als gespreadete, adherente Zellen zusammengefaßt.

3.2.6.3. Chemotaxis-Assay

Die migratorische Fähigkeit von elutrierten Blut-Monozyten wird mit Boyden Kammer (Blind Well Chamber, Neuro Probe, Gaithersburg, USA) {Martinet, Martinet, et al. 1994 ID: 142} untersucht. Für diesen Assay werden frisch elutrierte Monozyten verwendet. In die untere Chamber wird 210µL Macrophage-SFM-Medium+M-CSF supplementiert mit 10^{-8} M N-formylmethionyl-Leucyl-Phenylalnin (fMLP, Sigma) als Chemoattraktant so eingefüllt, dass ein Miniskus entsteht. Über diesen Miniskus wird vorsichtig und blasenfrei die PVP-freie Polycarbonat-Membran (5µm Porengröße) gelegt und die obere Kammer aufgesetzt und zugeschraubt. Die Membran hat zwei Seiten, eine raue und eine glänzende. Die glänzende beschichtete Seite wird mit dem Gesicht nach unten auf den Miniskus gelegt. In die obere Kammer werden 100.000 Zellen in 800µL Macrophage-SFM-Medium+M-CSF supplementiert mit den verschiedenen Antagonisten plaziert. Die Zellen werden für 12h bei 37°C in 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubation wird das Medium aus der oberen Kammer ausgeschlagen, die Kammer aufgeschraubt und die Membran vorsichtig mit einer Pinzette abgenommen. Die Zellen auf der oberen, rauchen Seite der Membran werden an einem feuchten Tuch abgewischt und die migrierten Zellen, die an der unteren Seite der Membran haften, werden mit der Quick-Diff-Färbung (Merck) angefärbt. Die Membranen werden später

mit Immersionsöl auf Glas-Objekt-Träger fixiert und die gewanderten Zellen mit einem 40x Objektiv ausgezählt. Es werden immer Dreifach-Bestimmungen quantifiziert.

3.2.7. Verschiedenes

3.2.7.1. Präparation von Lipoproteinen

Die Lipoproteine werden im hiesigen Labor durch sequentielle Ultrazentrifugation aus Serum normallipidämischer Spender hergestellt. Das Serum wird durch Rekalzifizierung von Plasma erhalten. Durch Dichte-Ultrazentrifugation in einer L-70-Ultrazentrifuge (Beckman, 70Ti-Rotor, 4°C) werden die verschiedenen Lipoproteinklassen aufgetrennt. Aufgetrennt werden folgende Lipoproteinfraktionen: VLDL ($d < 1.006 \text{ g/mL}$), IDL ($d = 1.006 - 1.019 \text{ g/mL}$), LDL ($d = 1.019 - 1.063 \text{ g/mL}$), HDL ($d = 1.063 - 1.21 \text{ g/mL}$), HDL₂ ($d = 1.063 - 1.125 \text{ g/mL}$), HDL₃ ($d = 1.125 - 1.21 \text{ g/mL}$).

Nach der Zentrifugation werden die Lipoproteinfraktionen ausgiebig in 150mM NaCl und 0.5mM Na₂EDTA (pH=7.5) bei 4°C dialysiert und elektrophoretisch auf Reinheit überprüft. Der letzte Dialyseschritt erfolgt gegen den Kochsalzpuffer ohne EDTA. Nach der Dialyse werden die Lipoproteinfraktionen steril filtriert.

Aus der LDL-Fraktion können durch verschiedene Behandlung modifizierte LDL hergestellt werden.

3.2.7.1.1. Präparation einer enzymatisch modifizierter LDL-Fraktion

Die Präparation wird in Anlehnung an Bhakdi et al. durchgeführt {Bhakdi, Dorweiler, et al. 1995 ID: 289}{Klouche, Rose-John, et al. 2000 ID: 290}. Die LDL-Fraktion wird mit Hepespuffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.0) zur Proteinkonzentration von 2 mg/mL verdünnt. Die Enzymbehandlung wird bei 37°C für 6-8hrs mit Trypsin (6.6 mg/mL, Sigma) und Cholesterin Esterase (40 mg/mL, Roche Biochemica) gestartet. Nachfolgend werden Trypsininhibitoren zugesetzt und der pH durch Zugabe von Morpholinoethane Sulfon Säure-Puffer (MES, pH 5.0) auf pH 5.5 herabgesetzt. Durch die Katalyse mit Neuraminidase (79 mU/mL, Behring) für 14 hrs bei 37°C werden die Proteine sialysiert und durch Zugabe von Mg-Ascorbat Lösung (30 mg/mL) einer Oxidation vorgebeugt. Später wird die Lösung mit 1m NaOH neutralisiert. Die Abwesenheit von Oxidationsprodukten in E-LDL wird durch den nachweis von Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) quantifiziert. LPS Kontaminationen der Lipoprotein Präparationen (HDL₃ und E-LDL) werden durch den Limulus amebocyte lysate kinetic assay (Kinetic-QCL, BioWhittaker) überprüft. Das Detektions Limit dieses Assays liegt bei 0.015 IU/mL {Steinbrecher, Parthasarathy, et al. 1984 ID: 291}.

3.2.7.1.2. Präparation einer AcLDL-Fraktion

Das Acetylieren von LDL erfolgt nach einer Vorschrift von Basu et al. Dazu wird LDL ankonzentriert auf eine Proteinkonzentration von 12mg/mL. Zum Acetylieren wird jeweils 1mL konz. LDL mit 1mL gesättigter Natriumacetat versetzt. Unter Rühren auf Eis werden kleine Mengen Acetanhydrid im Intervall von 5min zugegeben. Anschließend wird 30min weiter gerührt und entsprechend der anderen Lipoprotein-Präparation dialysiert.

3.2.7.2. Northern- und Western Blot-Quantifizierungen

3.2.7.2.1. Image Quant

Die Autoradiographien der Northern Blots werden alle mit einem Densitometer der Firma Molecular Dynamics gescannt. Die Auswertung erfolgt mit der Auswerte-Software Image Quant der gleichen Firma. Die quantitative Auswertung verschiedener Proben auf einem Film erfolgt über eine Volumenintegration gleicher Flächen nach Background-Subtraktion. Sie wird in „absolute volume“ angegeben.

Auch werden anfänglich Western Blots mit den gleichen Tools ausgewertet.

3.2.7.2.2. Lumi-Imager

Später werden die Western Blots mit dem Lumi Imager (Roche Diagnostics) quantitativ ausgewertet. Hierbei wird die Chemilumineszenz direkt exponiert. Die Auswertung erfolgt mit dem Lumi-Analyst. Die quantitative Evaluierung erfolgt über das gleiche Prinzip wie beim Image Quant. Die Werte werden hier in „absolute amounts“ angegeben.

3.2.7.3. Statistik

Sofern nicht anders angegeben werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus mehreren unabhängigen Messungen dargestellt. Die n-Zahlen werden jeweils bei den Ergebnisteilen im Einzelnen angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Meßwerten werden mittels Student's t-Test ermittelt. Als signifikant werden Unterschiede für $p < 0.05$ mit *p und Unterschiede für $p < 0.005$ mit **p angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Cholesterinhomöostase und Zellmigration

Die Auswanderung von Monozyten aus der Blutbahn in das subendotheliale Gewebe stellt einen der frühen Schritte in der Atherogenese dar, so dass die Regulation der Migration dieser Zellen von besonderem Interesse erschien. Bevor sich eine Zelle in Bewegung setzt, muss sie eine Formveränderung durchlaufen, die mit der Ausbildung von Membranprotrusionen verbunden ist. Diesen Prozess bezeichnet man als Ausbreitung oder Spreading, welcher durch das CDC42-Protein aus der Rho-Familie reguliert wird. Diese Proteine sind kleine GTP-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 18-24 kDa.

Bekannt ist die Funktion von CDC42 in der Regulation der Adhäsion und Migration von Monozyten. Die prominenteste Funktion von CDC42 ist die Regulation der zellulären Filopodien-Ausbildung. Die Ausbildung von Filopodien ist eine Voraussetzung für das Monozyten-Spreading und erforderlich für die Migration und Chemotaxis. Diese Prozesse der Migration, Adhäsion und Chemotaxis werden durch M-CSF stimuliert und forciert. M-CSF aktiviert somit die CDC42-regulierten Prozesse der Zellmigration. Aber auch Integrine können CDC42 aktivieren und somit das Zell-Spreading induzieren.

An erster Stelle des Ergebnisprotokolls wurde das Spreading während der M-CSF-induzierten Monozyten-Differenzierung untersucht. Dabei wurde die Modulation dieses zellulären Ereignisses nach Be- und Entladung mit Cholesterin durch modifizierte LDL und durch HDL₃/apo AI verifiziert.

4.1.1. Ausbreitung oder Zellspreeding von Monozyten

4.1.1.1. M-CSF-induziertes Spreading von Monozyten

Das Spreading-Verhalten von frisch isolierten Monozyten wurde während der M-CSF-induzierten Differenzierung vom Tag1 bis Tag5 untersucht. Nach Kultur, Fixation und Färbung wurden die Zellen lichtmikroskopisch analysiert. Eine semiquantitative Auswertung über das *in-vitro*-Spreading zeigt die Abb. 6. Dabei werden die Werte in % der ausgebreiteten Zellen von der gezählten Gesamtzellzahl angegeben. Die ausgezählte Gesamtzellzahl beträgt in allen Experimenten zwischen 150-200 Zellen.

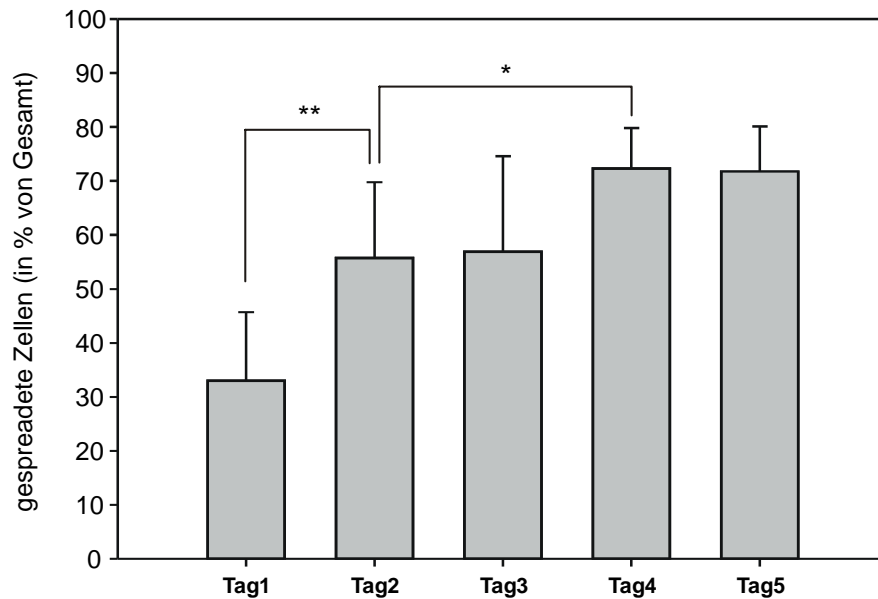


Abb.6: M-CSF-induziertes Spreading während der Monozyten-Differenzierung.

Monozyten wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen in M-CSF supplementierten Medium kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die semiquantitative Auswertung von 10 unabhängigen Experimenten. Die Werte sind in % der ausgebreiteten Monozyten von der gezählten Gesamt-Zellzahl ($n=150-200$) angegeben (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

Wie erwartet, nahm das Spreading der Monozyten über die *in vitro*-Kultur dramatisch zu. Schon nach einem Tag zeigten $33\pm 12.8\%$ der Zellen eine ausgebreitete Morphologie, welches im Weiteren als Spreading bezeichnet wird. Sie zeigten einen abgeflachten Zellkörper mit lang ausgestreckten Membranprotrusionen, sog. Filopodien. Der Prozentsatz der Zellen, die diesem Morphologie-Typus entsprachen, wuchs am Tag2 auf $55.7\pm 14.1\%$ an und erreichte am Tag4 ein Maximum von $72.3\pm 7.6\%$. Der Anstieg im Spreading vom Tag1 auf Tag2 war signifikant und verglichen mit den anderen Tagen am deutlichsten. Innerhalb der ersten drei Tage war somit der Zuwachs im Zell-Spreading am größten, später wurde nur noch ein leichter Zuwachs beobachtet. Auch nach längerer Kultivierungsdauer von bis zu 7 Tagen wurde der maximale Anteil ausgebreiteter Zellen von rund 75% nicht mehr überschritten.

4.1.1.2. Einfluss von apo AI und HDL₃ auf das M-CSF-induzierte Spreading

Die Monozyten wurden in diesem Ansatz kontinuierlich entweder mit $100\mu\text{g/mL}$ HDL₃ oder mit $10\mu\text{g/mL}$ Medium apo AI stimuliert. Da das Spreading bis zum Tag3 am deutlichsten anstieg, wurde im Folgenden der Einfluss dieser Agonisten bis zum Tag3 der *in-vitro*-Kultur dargestellt.

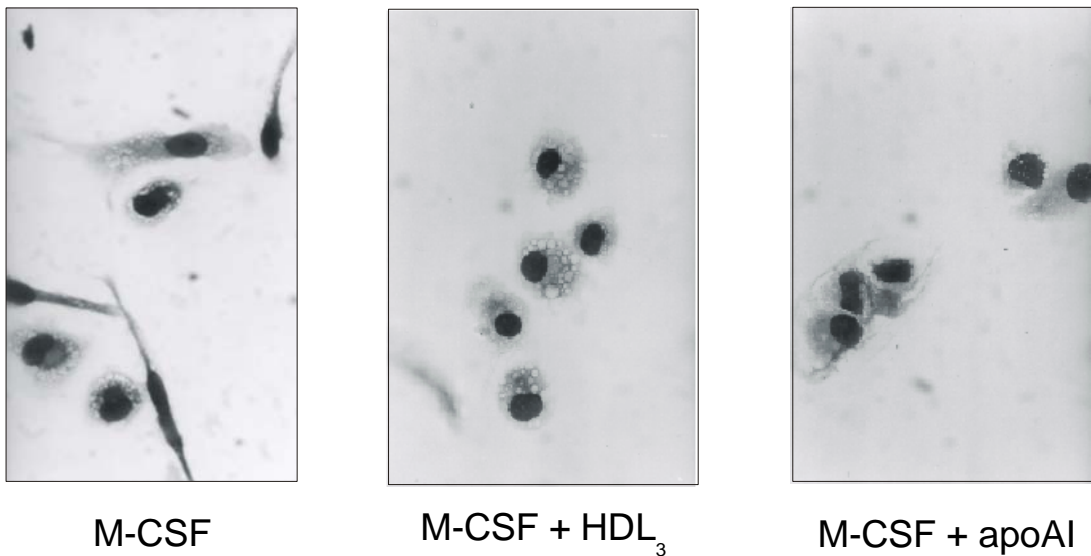


Abb.7: Einfluss von HDL₃ und apo AI auf das M-CSF induzierte Spreading.

Lichtmikroskopische Aufnahmen humaner Monozyten am Tag3 der *in-vitro* Kultur. Es wurden nebeneinander Monozyten der M-CSF-Kultur, der M-CSF-Kultur+HDL₃ und der M-CSF-Kultur+apoA-I dargestellt.

Wie auf der Abbildung 7 zu erkennen, inhibierte HDL₃ und apoA-I das M-CSF-induzierte Spreading der Monozyten. Morphologisch nahmen die Zellen eine runde Zellgestalt an. Die Ausbildung der Filopodien war stark reduziert und die Adhärenzfläche der Zellen war verkleinert. Weiter war zu erkennen, dass HDL₃ einen stärkeren Einfluss auf die Zellmorphologie als apoA-I besaß. Bei der apoA-I-Stimulation erschien die intrazelluläre Struktur aufgelockerter und die äußere Membran nicht konsistent abgerundet. Insgesamt zeigten die Zellen nach beiden Stimulationen eine vitale Morphologie. Bei allen drei Inkubationen waren im Zytoplasma Vakuolen zu erkennen. Eine semiquantitative Auswertung über den Einfluss von HDL₃ und apoA-I auf das Spreading liefert die Abb.8.

Dabei werden die Werte in % der ausgebreiteten Zellen von der gezählten Gesamtzellzahl angegeben. Die ausgezählte Gesamtzellzahl beträgt in allen Experimenten zwischen 150-200 Zellen.

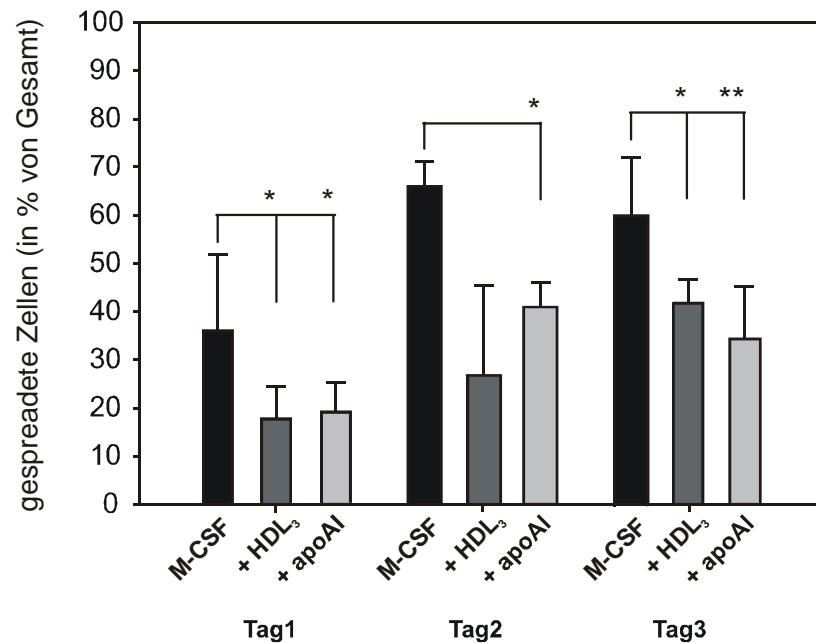


Abb.8: Einfluss von HDL₃ und apo AI auf das M-CSF induzierte Monozyten-Spreading.

Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm HDL₃ oder apo AI kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die semiquantitativen Auswertungen von 2 (HDL₃) bzw. 5 (apoA-I) unabhängigen Experimenten. Die Werte sind in % der gespreadeten Monozyten von der gezählten Gesamt-Zellzahl (n=150-200) angegeben (*p < 0.05, **p < 0.005).

Die quantitative Darstellung verdeutlicht den inhibitorischen Effekt von HDL₃ und apo AI auf das Zell-Spreading. Bei HDL₃ errechnete sich eine Abnahme des Spreadings um $19,2\% \pm 6,7\%$ auf $17,3\%$ am Tag1, um $39\% \pm 18,7\%$ auf $26,7\%$ am Tag2 und um $18,5\% \pm 4,9\%$ auf $41,3\%$ am Tag3. Für apoA-I ergaben sich die folgenden Werte für die Abnahme des Zell-Spreading: um $17,9\% \pm 6,3\%$ auf $18,8\%$ am Tag1, um $25\% \pm 5,2\%$ auf $40,9\%$ am Tag2 und um $26\% \pm 11,2\%$ auf $34,1\%$ am Tag3. Der inhibitorische Effekt beider Agonisten war während der gesamten Kultivierungsdauer sichtbar.

4.1.1.3. Effekt von p-Cyclodextrin und E- LDL auf das M-CSF-induzierte Spreading

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen dem ABCA1 vermittelten Cholesterinefflux und den Effekten von HDL₃ und apo AI auf die Zellausbreitung herzustellen, wurden die Zellen mit p-Cyclodextrin inkubiert. P-Cyclodextrin ist ein synthetischer und potenter Induktor des zellulären Cholesterineffluxes.

Im Vergleich zur Cholesterin-Entladung wurde der Effekt einer Cholesterinbeladung durch E-LDL auf das Monozyten-Spreading untersucht. E-LDL induziert schon in der frühen Phase der Monozyten-Differenzierung in der Zelle eine dramatische Cholesterin-Akkumulation und Speicherung.

Für diesen Ansatz wurden die Zellen mit 150µg/mL p-Cyclodextrin bzw. mit 40µg/mL E-LDL inkubiert.

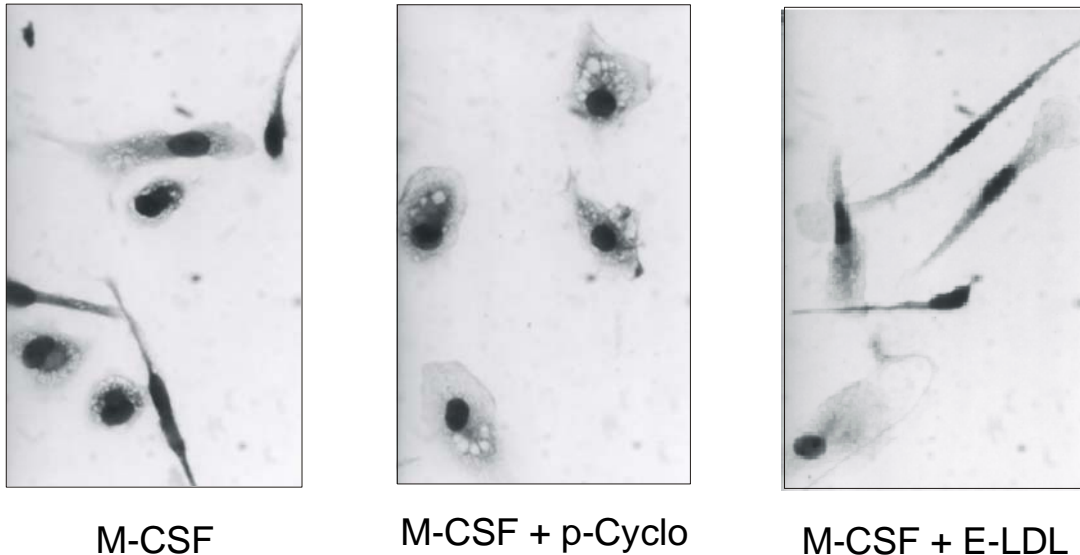


Abb.9: Einfluss von p-Cyclodextrin und E-LDL auf das M-CSF-induzierte Spreading.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen Monozyten am Tag3 der in-vitro Kultur. Es werden nebeneinander Monozyten der M-CSF-Kultur, der M-CSF-Kultur+p-Cyclo und der M-CSF-Kultur+E-LDL dargestellt.

Wie man den repräsentativen lichtmikroskopischen Bildern entnehmen kann, verursachte p-Cyclodextrin einen vergleichbaren Effekt wie apoA-I und HDL₃. Das M-CSF-induzierte Spreading wurde durch die Behandlung mit p-Cyclodextrin inhibiert. Morphologisch zeigten die Zellen die gleiche Veränderung wie bei der apoA-I-Stimulation. Im Gegensatz dazu besaß die Cholesterin-Beladung mit E-LDL einen stimulatorischen Effekt. Die Zellen bildeten schon in den frühen Phasen der Differenzierung ausgeprägte Filopodien aus. Während dieser Differenzierungs-Phase war die Anzahl der Filopodien-bildenden Zellen im Vergleich zur Kontrollbedingung signifikant erhöht.

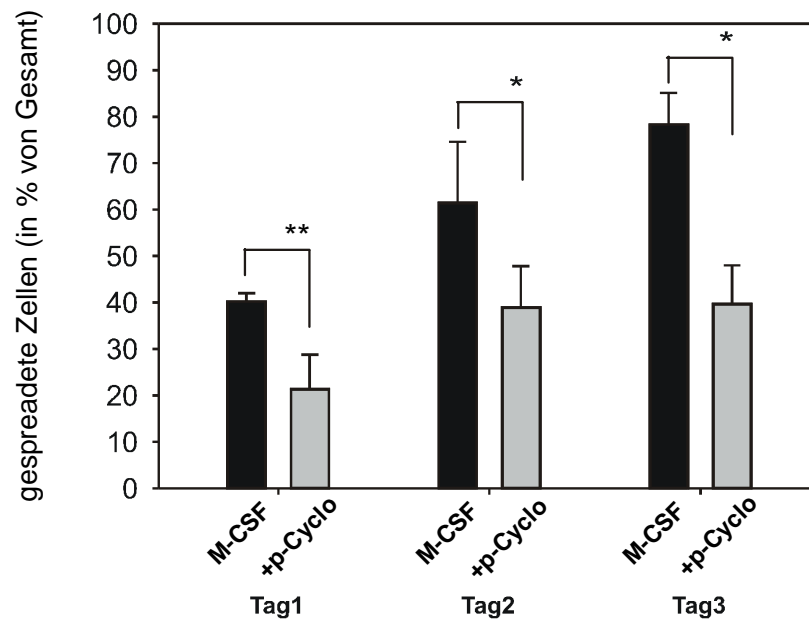


Abb.10: Einfluss von p-Cyclodextrin auf das M-CSF-induzierte Spreading.

Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm p-Cyclodextrin kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die quantitativen Auswertungen von 3 unabhängigen Experimenten (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

Durch die Inkubation mit p-Cyclodextrin wurde das M-CSF-induzierte Spreading von im Mittel 40,3% auf 21,3% \pm 7,4% am Tag1, von 61,5% auf 38,8% \pm 8,9% am Tag2 und von 78,3% auf 39,6% \pm 8,4% am Tag3 inhibiert.

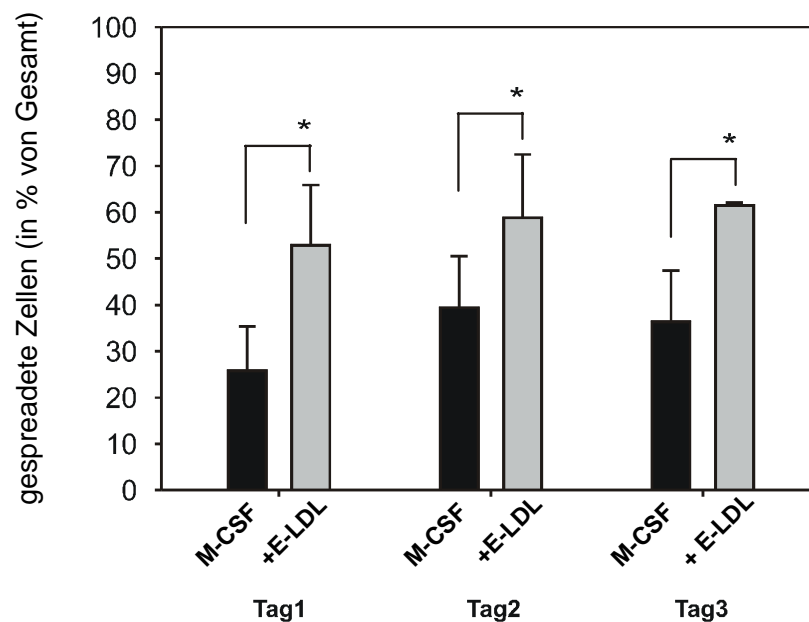


Abb.11: Einfluss von E-LDL auf das M-CSF-induzierte Spreading.

Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm E-LDL kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD stellen die quantitativen Auswertungen von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Werte sind in % der gespreadeten Monozyten von der gezählten Gesamt-Zellzahl ($n=150-200$) angegeben (* $p < 0.05$).

Durch die Cholesterinbeladung mit E-LDL errechnete sich quantitativ eine Steigerung im Zell-Spreading am Tag1 um $27,1\% \pm 13\%$, am Tag2 um $19,4\% \pm 13,7\%$ und am Tag3 um $25,2\% \pm 0,6\%$. Während der späteren M-CSF Differenzierung zeigten sich die E-LDL stimulierten Monozyten morphologisch als typische Schaumzelle. Ab diesem Zeitpunkt stand die Ausbildung der Filopodien nicht mehr im Vordergrund. Hier akkumulierten die Zellen Cholesterin und Cholesterinester in Vakuolen, blähten dabei ihren Zelleib auf und vergrößerten ihr Zellvolumen in einigen Fällen um das Doppelte.

4.1.2. fMLP-induzierte Chemotaxis von Monozyten

Um zu klären, ob die Effekte von apoA-I und HDL₃ auf das Spreading beschränkt waren oder auch die Migration der Zellen betrafen, wurde der Einfluss der oben genannten Agonisten auf die fMLP-induzierte Chemotaxis untersucht. Zu diesem Zweck wurden Boyden-Chamber Experimente durchgeführt. Die Monozyten wurden mit HDL₃, apo AI, p-Cyclodextrin und E-LDL stimuliert und die Chemotaxis im Vergleich zur M-CSF kultivierten verglichen. Als Chemoattraktant wurde fMLP in einer Konzentration von 10^{-8} gewählt, bei der die Monozyten eine optimale Beweglichkeit zeigten. Eine Zusammenfassung über diese Experimente liefert die Tabelle 3.

Agonisten	Bewegliche Zellen (% of M-CSF)	Signifikanz
M-CSF + HDL ₃ (n=2)	$29,7 \pm 17,8$	$*p < 0.03$
M-CSF + apo AI (n=3)	$56,4 \pm 18,8$	$*p < 0.02$
M-CSF + p-Cyclodextrin (n=2)	$35,1 \pm 6,9$	$*p < 0.01$
M-CSF + E-LDL (n=2)	$183,5 \pm 47,3$	$*p < 0.02$

Table 3: Effekt von HDL₃, apoA-I, p-Cyclodextrin und E-LDL auf die fMLP-induzierte Chemotaxis von humanen Monozyten.

Quantitative Auswertung des Chemotaxis-Assays nach Boyden. Dargestellt sind die Werte in % \pm SD der beweglichen Zellen nach der fMLP-Stimulation.

Analog zu den Ergebnissen im Zellspreeding inhibierte hier die Stimulation mit HDL₃, apo AI und p-Cyclodextrin die Beweglichkeit der Monozyten. Im Gegensatz dazu stimulierte die E-LDL-Stimulation die chemotaktische Aktivität der Monozyten entlang des fMLP-Gradienten.

4.2. Mögliche Zielproteine und Effektoren des ABCA-1-Pathways

4.2.1. Effekte der Cholesterinhomöostase auf die Regulation der für Adhäsion und Differenzierung relevanten Oberflächenmoleküle durch HDL₃, apo AI und E-LDL

Nachdem HDL₃, apo AI und E-LDL einen eindeutigen Effekt auf das M-CSF-induzierte Spreading und die fMLP-induzierte Chemotaxis von Monozyten gezeigt hatten, sollte untersucht werden, ob diese Agonisten auf die Expression der für Adhäsion und Differenzierung relevanten Oberflächenmarker einen Einfluss haben. Dafür wurden die Zellen in hydrophobe Petrischalen für 5 Tage in M-CSF supplementiertem Medium kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde kontinuierlich mit HDL₃, apo AI oder E-LDL inkubiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde am Tag1, Tag3 und Tag5 der *in-vitro*-Kultur mittels FACS-Analyse analysiert.

4.2.1.1. Effekt von M-CSF auf die Expression der Oberflächen-Antigene

Wie erwartet, wurden die Expressionen der β_2 -Integrine (CD11a, CD11b, CD11c) und der β_1 -Integrine (CD49d, CD49e), der Scavenger Rezeptoren CD163 und CD36 und auch des Fc γ -IIIa-Rezeptors (CD16) während der M-CSF-induzierten Differenzierung signifikant hochreguliert. Das Ausmaß der Hochregulation wird quantitativ in Tabelle 4 dargestellt.

Monozyten	Kontrollen	
	M-CSF (n=8) (% vom Tag1)	Signifikanz
β_2-Integrine		
CD11a	154,3 \pm 33	* <i>p</i> = 0.001
CD11b	209,9 \pm 61,8	* <i>p</i> = 0.0009
CD11c	189,9 \pm 41,1	* <i>p</i> = 0.0003
β_1-Integrine		
CD49d	291,1 \pm 160,5	* <i>p</i> = 0.002
CD49e	438,5 \pm 173,2	* <i>p</i> = 0.0001
Scavenger Rezeptoren		
CD163	1692,5 \pm 1876,3	* <i>p</i> = 0.01
CD36	484,6 \pm 226,3	* <i>p</i> = 0.01
FcγIIIaR		
CD16	154,3 \pm 33	* <i>p</i> = 0.001

Tabelle 4: Effekt von M-CSF auf die Expression von Oberflächen-Antigene am Tag3 (% von Tag1).

Humane Monozyten wurden in M-CSF supplementierten Medium für 3 Tage kultiviert. Die Expression der Oberflächen-Antigene wurde in % vom Tag1 (Ausgangswert) errechnet. Statistische Signifikanz wird mit **p* angegeben.

Die Expression der β_2 -Integrine und β_1 -Integrine stieg unter M-CSF von Tag1 zum Tag3 zwischen ca. 150% und 400% an. Die Expression der Scavenger Rezeptoren CD163 und CD36 erfuhr eine noch stärkere Hochregulation. Der Fc γ -IIIaR (CD16) wurde, verglichen zum Ausgangswert, um ca. 150% hoch reguliert. Somit zeigte sich M-CSF als ein Faktor, der für die Differenzierung der Monozyten essentiell war. Die Prozesse der Adhäsion und des Scavenging stehen mit der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in direkter Verbindung.

4.2.1.2. Einfluss von HDL₃, apo AI und E-LDL auf die Expression der Oberflächen-Antigene

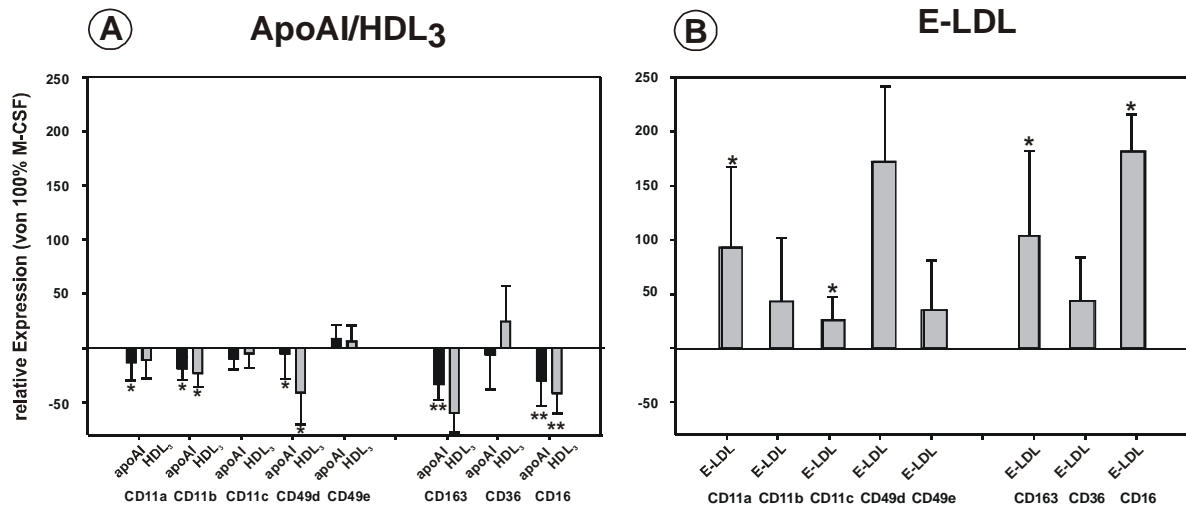


Abb. 12: Einfluss von HDL₃, apo AI und E-LDL auf die M-CSF induzierte Expression der Oberflächen-Antigene in humanen Monozyten.

Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm 100 μ g/mL HDL₃, 10 μ g/mL apo AI oder 40 μ g/mL E-LDL kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die Auswertungen von n=5 für apo AI, n=4 für HDL₃ und n=4 für E-LDL. Die relative Expression in % von M-CSF wird angegeben. (*p < 0.05, **p < 0.005).

Die M-CSF-induzierte Hochregulation der Oberflächen-Expression wird mit Ausnahme der CD49e- und CD36-Expression durch HDL₃ und apo AI signifikant supprimiert. Für die β_2 -Integrine ließ sich im Mittel eine Reduktion der Expression von 10-20% für apo AI und von 5-30% für HDL₃ errechnen. Bei der CD49d-Expression wurde durch HDL₃ eine Reduktion von 40% vermessen, durch apo AI eine von 5%. Insbesondere die Expression von CD163 und CD16 erfuhr sowohl durch HDL₃ als auch durch apo AI eine deutliche Verminderung. Bei der CD163-Expression wurde durch HDL₃ eine Reduktion von 60% erreicht. Im Gegensatz dazu konnte bei CD49e und CD36 kein Effekt durch HDL₃ oder durch apo AI auf die Expression festgestellt werden. Somit modulierte der durch HDL₃ und apo AI induzierte Cholesterinefflux die Expression der für Differenzierung, Adhäsion und Scavenging verantwortlichen Antigene.

Analog zu den Untersuchungen beim Zell-Spreading wurde die Regulation der Oberflächen-Antigen-Expression, nach der Beladung der Zellen mit Cholesterin, durch E-LDL untersucht. Die Inkubation mit E-LDL resultierte in einer Stimulation der M-CSF-abhängigen Expression der meisten Oberflächen-Rezeptoren.

Den größten Effekt hatte die Cholesterin-Beladung auf die Expression von CD163 und CD16, die durch apo AI und HDL₃ am stärksten supprimiert wurden. Auch die β_2 -Integrine und β_1 -Integrine wurden in ihrer Expression durch E-LDL hochreguliert.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass apo AI und HDL₃ die MCSF-induzierte Differenzierung der Monozyten abschwächte, hingegen E-LDL die Differenzierung förderte. Dabei waren CD16 und CD163 die sensitivsten Oberflächen-Marker, die durch den zellulären Cholesterin-Gehalt moduliert wurden.

4.2.2. Expression von CDC42 als Regulator des Zytoskeletts in Monozyten

Um den potentiellen Mechanismus zu klären, der dem inhibitorischen Effekt von HDL₃ und apo AI auf das Monozyten-Spreading und Chemotaxis zugrunde liegt, wurden Protein-Expressionsuntersuchungen von CDC42 vorgenommen. CDC42 ist an der Bildung von Membranprotrusionen in Form von Filopodien und der damit einhergehenden Restrukturierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt.

Zunächst wurde die Expression während der M-CSF-induzierten Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, später der Einfluss der Lipoproteine auf die Expression untersucht. Die Untersuchungen im Monozytensystem wurden ausschließlich an elutrierten Monozyten vorgenommen, die nach Reinigung durch die Gegenstrom-Zentrifugation in mit M-CSF supplementiertem, serumfreien Makrophagen-Medium kultiviert wurden.

Die Expression der mRNA und des Proteins von CDC42 wurde während der M-CSF-induzierten Differenzierung vom Monozyten zum Makrophagen untersucht. Am hiesigen Institut ist ein Kultivierungsschema dieser Differenzierung etabliert worden [Stöhr et al. (1998)]. Während einer bis zu 7 täglichen Kultivierung der Blutmonozyten in M-CSF-haltigem Medium differenzieren sie zu Makrophagen-ähnlichen Zellen. Sie gleichen nach dieser Differenzierung hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres funktionellen Repertoires ruhenden Gewebsmakrophagen.

4.2.2.1. RNA-Expression während der M-CSF-induzierten *in-vitro*-Differenzierung

Die Monozyten wurden direkt nach der Elutriation in M-CSF-haltiges (50ng/mL) Medium kultiviert. Während den verschiedenen Phasen der Differenzierung wurden die Monozyten/Makrophagen mit biologisch aktiven Substanzen stimuliert.

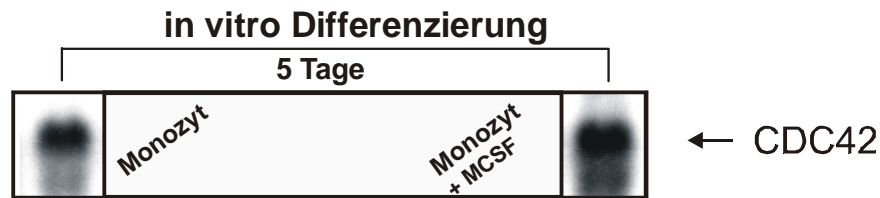


Abb.13: Northern Blot-Analyse von CDC42 in Monozyten und Makrophagen.

Jeweils 15µg Gesamt-RNA wurden auf einem Formaldehydgel aufgetrennt. Ein α -[P³²]-markiertes CDC42-cDNA-Fragment mit einer Länge von 907bp wurde als Sonde eingesetzt. Die Radioautographie wurde 24h exponiert. Es wurden Monozyten und M-CSF-differenzierte Makrophagen aufgetragen.

Wie auf dem Northern Blot zu erkennen, waren die Expressionsunterschiede auf der RNA-Ebene gering. Weder die Differenzierung zum Makrophagen noch die Stimulation mit den angegebenen Agonisten änderte die RNA-Expression deutlich. Die Monozyten-Proben wurden 12h nach der Elutriation abgesammelt. Die Stimulationen beim Monozyten mit HDL₃ und AcLDL verliefen über einen Zeitraum von 6h bzw. 24h. Der Makrophage war 5 Tage differenziert und jeweils für 6h mit HDL₃ oder Ceramid stimuliert worden. Die Beladung mit acLDL verlief über einen Zeitraum von 24h, die Entladung mit HDL₃ für 6h. Die quantitative Auswertung der Northern-Blot-Analyse machte deutlich, dass nach der Stimulation mit den Agonisten keine eindeutige Regulation zu beobachten war. Bei der Differenzierung vom Monozyt zum Makrophagen konnte ein Anstieg der Expression von 15% beobachtet werden.

4.2.2.2. Protein-Expression während der *in-vitro*-Differenzierung

Die Monozyten wurden nach der Elutriation auf Petrischalen mit einer Zelldichte von $10 \times 10^6 / 10 \text{ mL}$ Medium ausgesät. Die Zellen konnten für 12h adhären und wurden für den ersten Zeitpunkt (Tag1) abgesammelt. Die weiteren Zeitpunkte wurden chronologisch jeweils nach weiteren 24h festgelegt. Die CDC42-Expression wurde in Monozyten und Makrophagen aus dem Gesamtzellextrakt bestimmt.

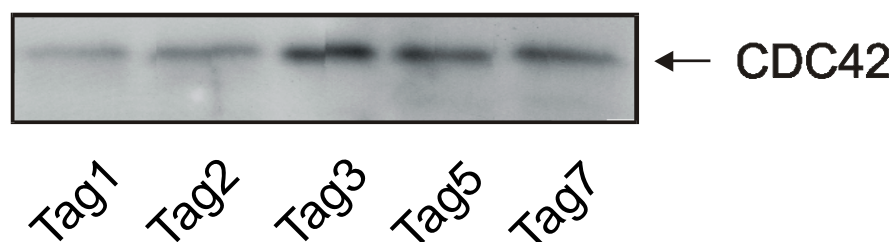


Abb.14: CDC42-Expression während der M-CSF Differenzierung vom Monozyt zum Makrophagen.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen Anti-CDC42-AK (1:1000) und einem POD-markierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit, 1:2000). Es wurden nebeneinander Proben über den Verlauf der Differenzierung am Tag1, Tag2, Tag3, Tag5, Tag7 aufgetragen.

M-CSF-induzierte Differenzierung				
Tag1	Tag2	Tag3	Tag5	Tag7
100%	159,6%	296,6%	232,4%	221,9%

Tab. 5: Quantitative Auswertung der Western Blot-Analyse.

Die Werte beziehen sich auf die Expression des Monozyten nach 12h Kultur. Es wurden die OD-Werte der Image-Quant Auswertung in % der Monozyten Expression (100%) angegeben.

Wie man dem repräsentativen Western Blot und der quantitativen Auswertung entnehmen kann, stieg die Protein-Expression von CDC42 während der Differenzierung vom Monozyten zum Makrophagen signifikant an. Dieser Anstieg erreichte am Tag3 ein Maximum.

4.2.2.3. CDC42-Proteinexpression in Monozyten nach Agonisten Stimulation

Nach der beobachteten Hochregulation von CDC42 während der Differenzierung vom Monozyten zum Makrophagen war zunächst die Regulation durch HDL₃ und apo AI Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.2.2.3.1. Regulation der CDC42-Proteinexpression durch HDL₃

Hierfür wurden die Monozyten am Tag1 und am Tag4 der Kultur für 24h mit HDL₃ stimuliert. Den Effekt auf die CDC42-Regulation zeigt in Abb.15 ein repräsentativer Western Blot.

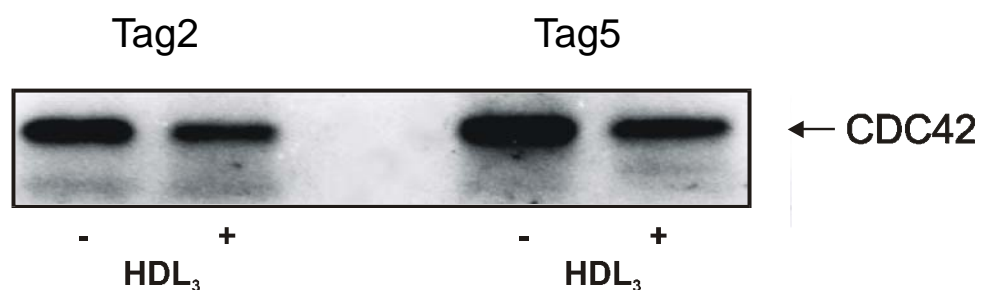


Abb.15: CDC42-Proteinexpression nach HDL₃-Stimulation am Tag2 und Tag5.

Jeweils 80µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben am Tag2 und Tag5 ± HDL₃ aufgetragen.

Wie gezeigt, erfuhr das Monozyten-Spreading durch die HDL₃-Stimulation eine Inhibition. In Korrelation dazu, zeigt auch die CDC42-Expression durch Stimulation mit HDL₃ eine Verminderung. Diese Suppression ließ sich sowohl im Gesamtprotein als auch in der Membranfraktion nach Auftrennung des Gesamtproteins in Membranfraktion und Zytosol detektieren. Die erhöhte Expression während der Differenzierung und die erniedrigte nach HDL₃-Inkubation wurden an verschiedenen Normalspendern gezeigt.

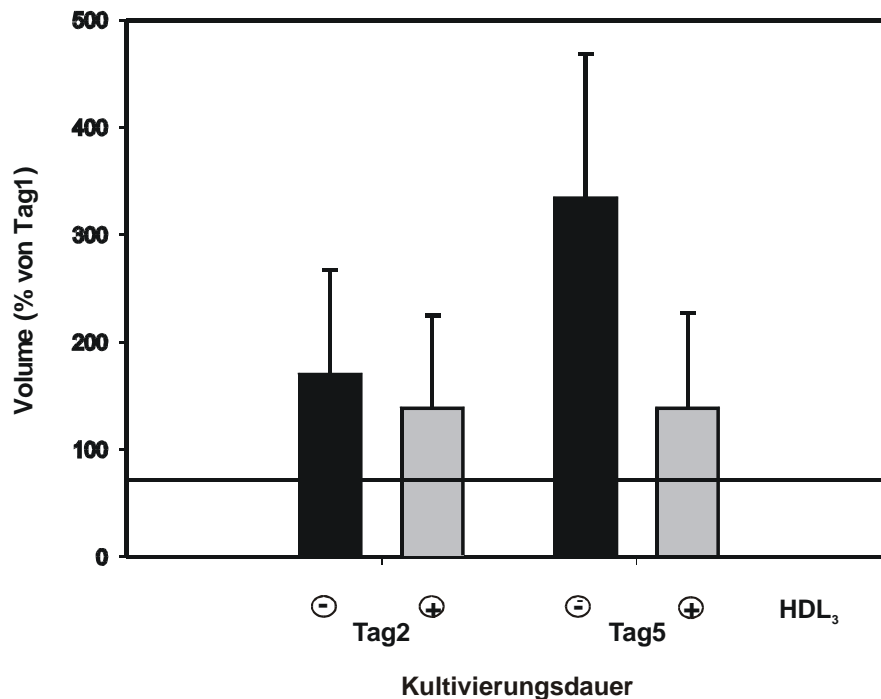


Abb.16: CDC42-Expression während der Differenzierung und nach HDL₃-Stimulation.

Dargestellt sind die Prozentwerte der Expression vom Tag1 (100%). Es wurden die Expressionen vom Tag2 \pm HDL₃ und vom Tag5 \pm HDL₃ nebeneinander abgebildet. Die Werte stellen die Mittelwerte von 8 unabhängigen Experimenten an Normalspendern dar.

Die Expression von CDC42-Protein wurde im Mittel von Tag1 auf Tag5 um ca. 230% hochreguliert. Die Inkubation mit 100µg/mL Medium HDL₃ suppressierte die Expression am Tag2 um 30% (in % von M-CSF) und am Tag5 um 60%. Wie man den Standardabweichungen entnehmen kann, unterlagen die Einzel-Werte einer starken Streuung.

4.2.2.3.2. Regulation der CDC42-Proteinexpression durch apo AI

Die Inkubation mit 10µg/mL apo AI erfolgte im M-CSF supplementierten Medium für 24h. Repräsentativ für diesen Ansatz steht der nachfolgende Blot.

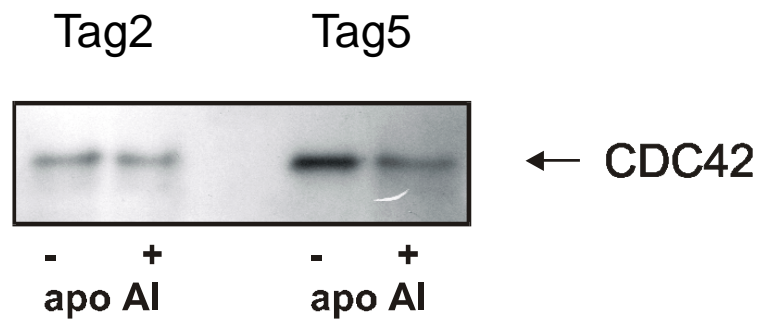


Abb.17: CDC42-Expression nach apo AI-Stimulation am Tag2 und Tag5.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben am Tag2 und Tag5 \pm apo A-I aufgetragen.

Die Stimulation mit der Haupt-Protein-Komponente des HDL₃, dem apo A-I bewirkte eine Supprimierung der CDC42-Expression. Analog zu der Stimulation mit HDL₃ ist die Regulation durch apo A-I am Tag5 deutlicher als am Tag2. Eine Zusammenfassung über die apo AI-Stimulation liefert die Abb.18.

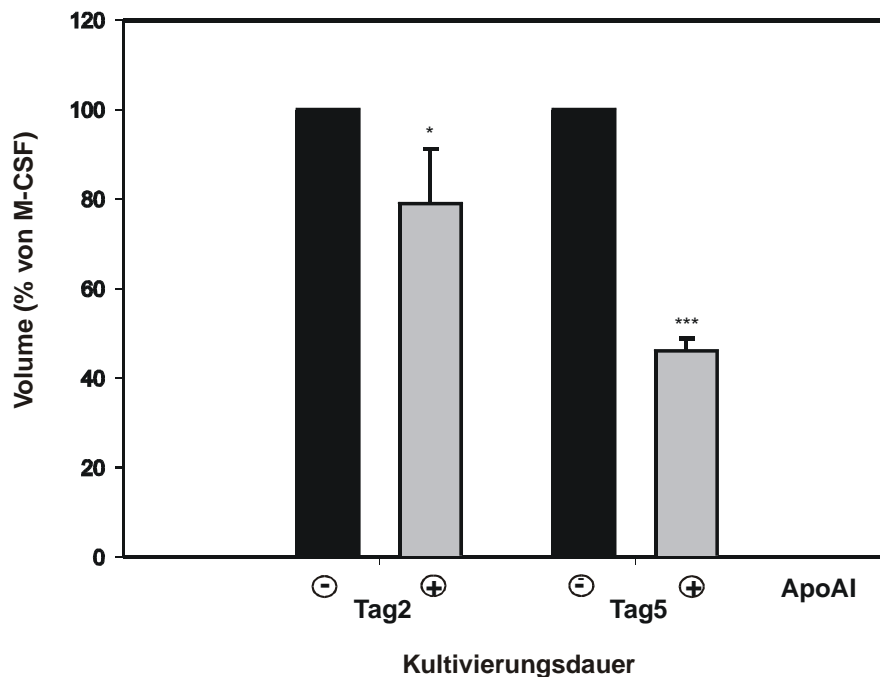


Abb.18: CDC42-Proteinexpression nach apo AI-Stimulation.

Dargestellt sind die Prozentwerte (M-CSF = 100%) der Expression nach apo A-I-Stimulation. Es wurden die Expressionen vom Tag2 \pm apo A-I und vom Tag5 \pm apo A-I nebeneinander abgebildet. Die Werte stellen die Mittelwerte von 3 unabhängigen Präparationen aus Normalspendern dar.

Vergleichend zur HDL₃-Stimulation erfuhr das Protein im Mittel am Tag2 durch apo A-I eine Verminderung in der Expression um 20% und am Tag5 eine um 50%. Bezogen auf den M-CSF-Wert (100%) waren die Werte der apoA-I-Stimulation signifikant.

Zur weiteren Absicherung und Verifizierung wurde das Inkubationsschema, wonach die Stimulation der Zellen über 24h ab einem definierten Zeitpunkt der *in-vitro*-Kultur verlief, umgestellt. Nachdem die Hochregulation der CDC42-Expression durch M-CSF am Tag3 der Differenzierung ein Maximum erreichte, wurden die Zellen einer kontinuierlichen Stimulation mit 10µg/mL apoA-I über die Kultivierungsdauer von 3 Tagen ausgesetzt.

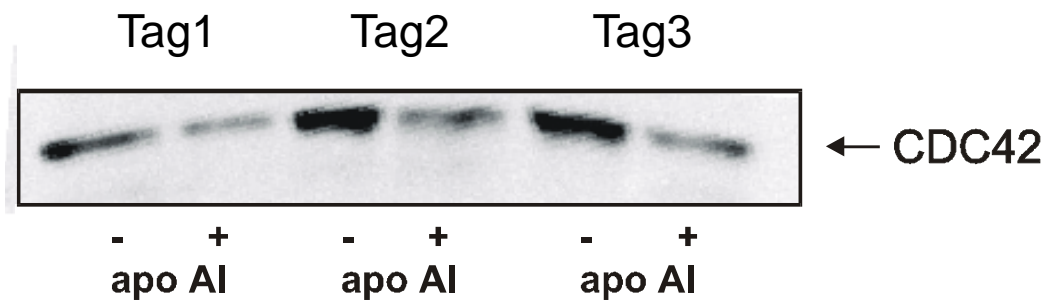


Abb.19: CDC42-Expression nach kontinuierlicher apo A-I-Stimulation am Tag1, Tag2 und Tag3.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen Anti-CDC42 AK (1:250). Es wurden nebeneinander Proben am Tag1, Tag2 und Tag3 ± apo AI aufgetragen.

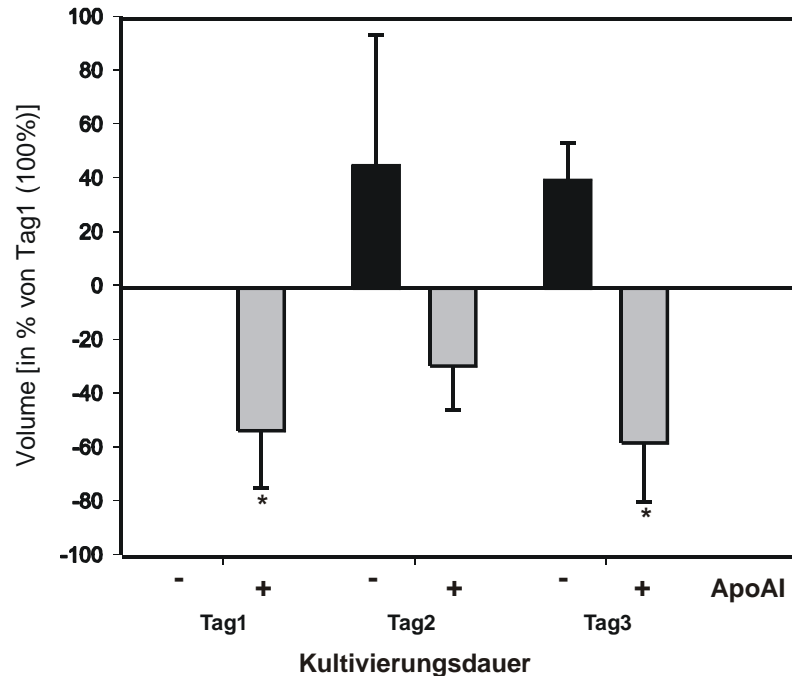


Abb.20: CDC42-Proteinexpression nach kontinuierlicher apoAI-Stimulation.

Dargestellt sind die Prozentwerte der Expression vom Tag1 (100%). Es wurden die Expressionen vom Tag1 ± apo AI, Tag2 ± apo AI und vom Tag3 ± apo AI nebeneinander abgebildet. Die Werte stellen die Mittelwerte von 2 unabhängigen Präparationen aus Normalspendern dar (*p < 0.05).

Die CDC42-Expression wurde einerseits während der M-CSF-induzierten Monozyten Differenzierung hochreguliert und andererseits durch apo A-I supprimiert. Dies bestätigte die schon erhobenen Befunde. Zugleich wurde deutlich, dass eine kontinuierliche Inkubation mit apo A-I, vor allem in der frühen Phase der Kultivierung, einen größeren Effekt auf die CDC42-Regulation besitzt als eine Kurzzeit-Stimulation. Im Mittel wurde die Expression am Tag1 und am Tag2 um ca. 50%, am Tag3 um ca. 70% supprimiert.

HDL₃ und apo A-I induziert in Zellen den Cholesterin-Efflux. Ein weiterer potenter Induktor des Cholesterin-Efflux ist der unspezifische Lipidakzeptor p-Cyclodextrin. Um die Regulation von CDC42 durch HDL₃ und apo A-I im funktionellen Zusammenhang mit dem Cholesterin-Efflux zu beurteilen, wurden die Zellen mit p-Cyclodextrin stimuliert.

4.2.2.3.3. Regulation der CDC42-Proteinexpression durch p-Cyclodextrin

Analog dem Ansatz der apoA-I-Stimulation wurden die Monozyten über die Kultivierungsdauer von 3 Tagen einer kontinuierlichen Stimulation von 150 µg/mL Medium p-Cyclodextrin ausgesetzt.

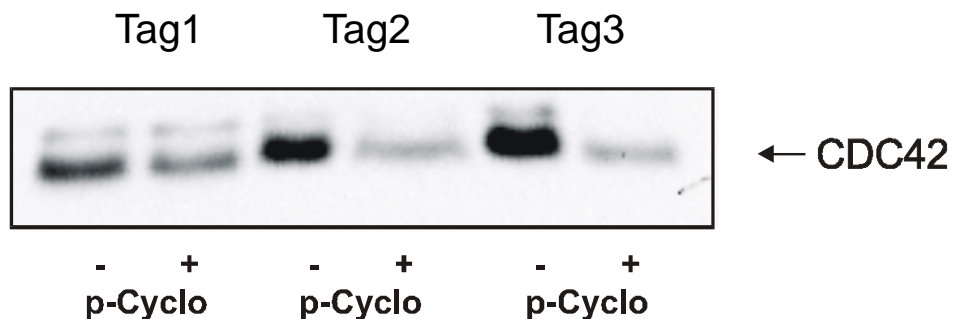


Abb.21: CDC42-Expression nach kontinuierlicher p-Cyclodextrin-Stimulation

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben am Tag1, Tag2 und Tag3 ± p-Cyclodextrin aufgetragen.

Tag1+M-CSF		Tag2+M-CSF		Tag3+M-CSF	
- p-Cyclo	+ p-Cyclo	- p-Cyclo	+ p-Cyclo	- p-Cyclo	+ p-Cyclo
100 %	53,4%	146%	45,6%	233%	36,3%

Tab. 6: Quantitative Auswertung der Western Blot-Analyse.

Die Werte beziehen sich auf die Expression des Monozyten nach 12h Kultur ohne Stimulation (100%).

Die Expression von CDC42 während der Monozyten-Differenzierung wurde bei dieser Präparation von 100% am Tag1 auf 233% am Tag3 induziert. Die Wirkung von p-Cyclodextrin auf die CDC42-Expression war eindeutig. Am Tag1 wurde die Expression um 45%, am Tag2 um 70% und am Tag3 um 80% supprimiert.

Die Cholesterin-Entladung von Monozyten bzw. Makrophagen mit HDL₃, apo AI oder p-Cyclodextrin moduliert die CDC42-Signaltransduktion und supprimiert seine Expression. Die Regulation der CDC42-Expression wurde im Folgenden nach Cholesterin-Beladung der Zellen durch modifiziertes E-LDL untersucht.

4.2.2.3.4. Regulation der CDC42-Proteinexpression durch E-LDL

Die Zellen wurden für 24h am Tag1 und am Tag4 mit 40µg/mL Medium E-LDL stimuliert.

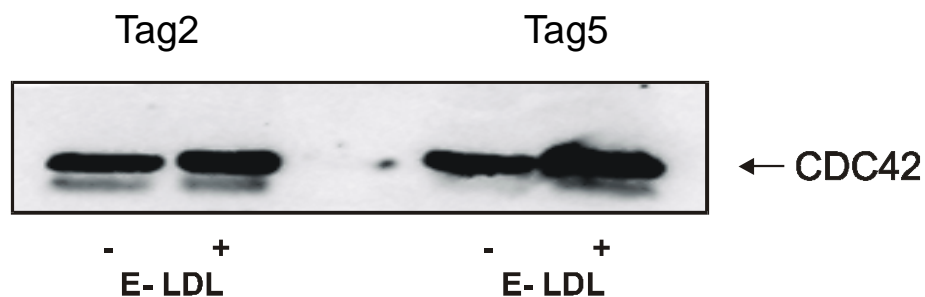


Abb.22: CDC42-Expression nach E-LDL-Stimulation am Tag2 und Tag5.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben am Tag2 und Tag5 \pm E-LDL aufgetragen.

Durch die Inkubation mit E-LDL erfuhr das CDC42-Protein eine Hochregulation in seiner Expression. Am Tag 2 kam es zu einer Verdopplung der Protein-Expression. Am Tag 5 wurde das Protein bezogen auf den unstimulierten M-CSF-Wert um 200% hoch reguliert.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die CDC42-Expression während der Monozyten-Differenzierung eine Hochregulation erfährt.

Analog zu der Inhibition des Monozyten-Spreading durch HDL₃ und apo AI wurde auch bei der CDC42-Proteinexpression durch die Cholesterinentladung eine Suppression der Expression gefunden. Andererseits wurde durch die Cholesterin-Beladung mit der enzymatisch modifizierten LDL-Fraktion eine Hochregulation der CDC42-Expression beobachtet.

Somit werden sowohl das Monozyten-Spreading als auch die CDC42-Proteinexpression durch diese Lipoproteine in gleicher Weise reguliert. Dies weist auf eine Funktion von CDC42 in der Lipoprotein-vermittelten Regulation der Zellmigration hin.

4.2.2.4. Intrazelluläre CDC42-Proteinexpression in Monozyten

Die Messung der intrazellulären Expression von CDC42 in der FACS-Analyse diente zur weiteren Verifizierung der gefundenen Ergebnisse. Dabei wurde der Einfluss von apo AI (10µg/mL), HDL₃ (100µg/mL) und E-LDL (40µg/mL) auf die M-CSF-induzierte Differenzierung analysiert. Die Messung der intrazellulären Expression verlief nach dem Protokoll von Jung et al. [Jung et al. (1993)].

Die Kontroll-Monozyten wurden in einem Zeitraum von 5 Tagen in M-CSF-haltigen Medium kultiviert und ein Teil der Zellen kontinuierlich mit apo AI, HDL₃ oder E-LDL inkubiert.

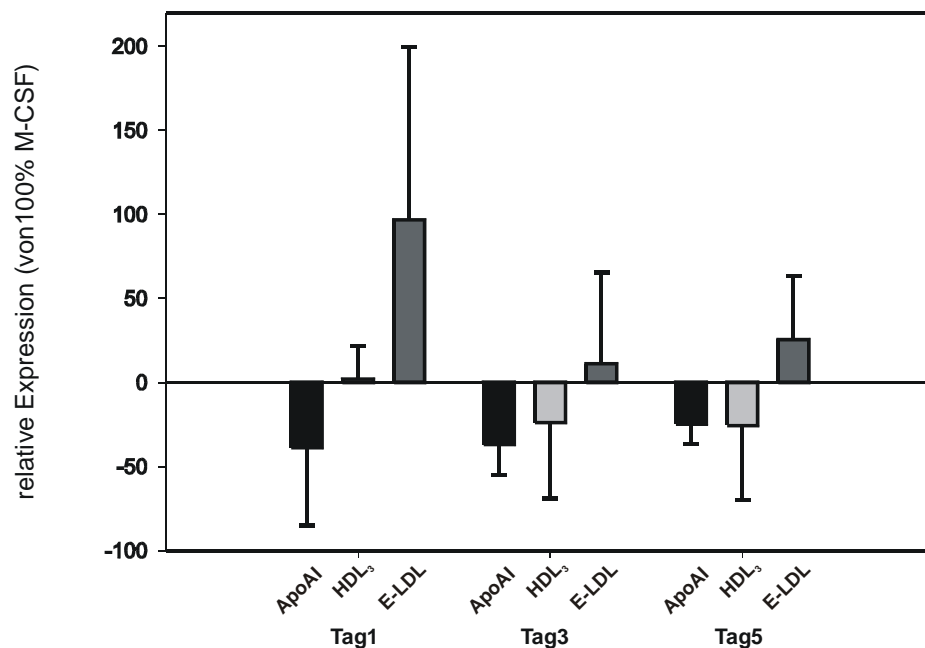


Abb. 23: Einfluss von apo AI, HDL₃ und E-LDL auf die CDC42-Expression in humanen Monozyten.

Die Daten repräsentieren die relative CDC42-Expression nach Agonisten-Stimulation in % von M-CSF. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die Auswertungen von n=3 für apo AI (schwarze Balken), n=2 für HDL₃ (hellgraue Balken) und n=4 für E-LDL (dunkelgraue Balken). (*p < 0.05, **p < 0.005).

Die CDC42-Expression wurde durch apo AI an allen drei Zeitpunkten supprimiert. Allerdings wurden keine Signifikanzen erreicht. Bei HDL₃ wurde am Tag3 und Tag5 eine Reduktion der Expression festgestellt. Durch E-LDL wurde die Expression an jedem Messpunkt hochreguliert.

Insgesamt bestätigten die Flow-Zytometrischen-Analysen der intrazellulären CDC42-Expression die Western-Blot-Ergebnisse im Gesamt-Zell-Homogenat.

4.2.3. Aktivitätsmessung von CDC42, „Pull-Down-Assay“

Die bisherigen, in Monozyten erhobenen Expressionsuntersuchungen von CDC42, lassen keine direkte Aussage über den Aktivierungszustand des GTP-bindenden-Proteins zu. Funktionell aktives, GTP-geladenes CDC42 lässt sich mit Hilfe des GST-PAK-Pull-Down-Assays detektieren.

Aufgrund der engen Korrelation zwischen der CDC42-Expression und dem Monozyten Spreading, sowohl in der Differenzierung als auch in der Modulation durch apoA-I und HDL₃, wurde die CDC42-Aktivität nach apo AI-Stimulation analysiert.

Die Monozyten wurden für 3 Tage in MCSF-haltigen Medium \pm apoA-I kultiviert und jeweils Proben am Tag1, Tag2 und Tag3 abgesammelt.

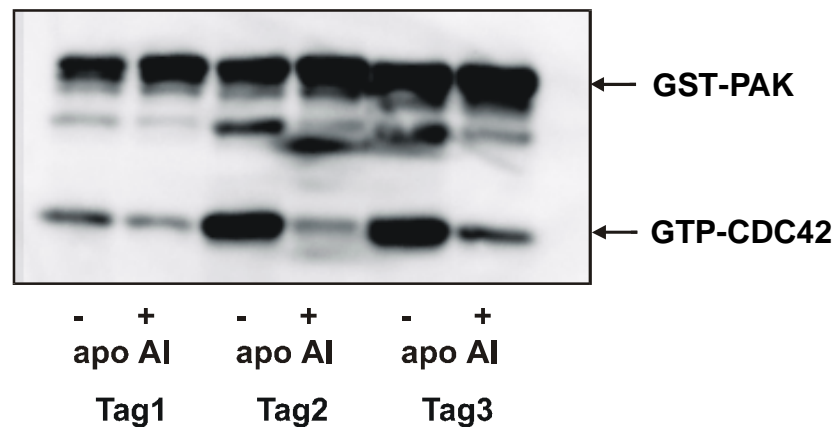


Abb.24: GST-PAK-Pull-Down-Assay in Kontrollmonozyten nach apoA-I-Stimulation.

Gleiche Mengen an Protein wurden mit GST-PAK inkubiert und auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben vom Tag1, Tag2 und Tag3 \pm apoA-I aufgetragen.

Wie auf der Abb. 24 zu erkennen, stieg die Expression der aktiven, GTP-geladenen CDC42-Fraktion vom Tag1 auf Tag2 während der M-CSF-Induktion signifikant an. Weiterhin wurde die Expression dieser CDC42-Fraktion nach apoA-I-Stimulation bei allen Zeitpunkten supprimiert. Das bedeutet, dass die aktive CDC42-Fraktion sowie die Gesamt-Expression in Monozyten durch apoA-I moduliert wurden.

4.2.4. M-CSF-induziertes Spreading nach CDC42-AS Behandlung

4.2.4.1. In vitro-Uptake der Antisense-Oligonukleotide in Monozyten

Um eine direkte funktionelle Beziehung zwischen CDC42 und der Regulation des Monozyten-Spreading herzustellen und dessen Beteiligung zu verifizieren, wurden die Monozyten mit spezifischen CDC42-Antisense Oligonukleotiden inkubiert.

Zunächst wurde die spezifische, fluoreszente Aufnahme der Antisense-Oligonukleotide in die Zellen bestimmt, um gegebenenfalls morphologische Veränderungen an den Zellen zu beobachten. Der Fluoreszenz-Uptake nach 24h gegenüber der Autofluoreszenz wurde dokumentiert.

Auf den Images war zu erkennen, dass die Fluoreszenz von der gesamten Zelle aufgenommen wurde. Der Kern schien noch stärker als das Zytoplasma angefärbt zu sein. Bei einem Teil der Zellen ließen sich die Filopodien mit dem fluoreszentem Oligonukleotid anfärben. Morphologisch war bei einigen Zellen zu erkennen, dass sie sich abrunden, kleiner im Zellvolumen und in der Ausbreitung ihrer Filopodien waren.

Bei der Überprüfung der AS-Stimulation auf die CDC42-Protein-Expression konnte eine Verminderung in der Expression von 36% gegenüber der M-CSF-induzierten Expression detektiert werden.

4.2.4.2. Einfluss der CDC42-Antisense auf das Zellspredding

Die Zellen wurden sowohl mit der spezifischen AS als auch mit dem Random-Oligonukleotid inkubiert. Die Konzentration wurde nach Austitration der AS auf 1µM/mL Medium festgelegt. Die Stimulation wurde alle 24h wiederholt.

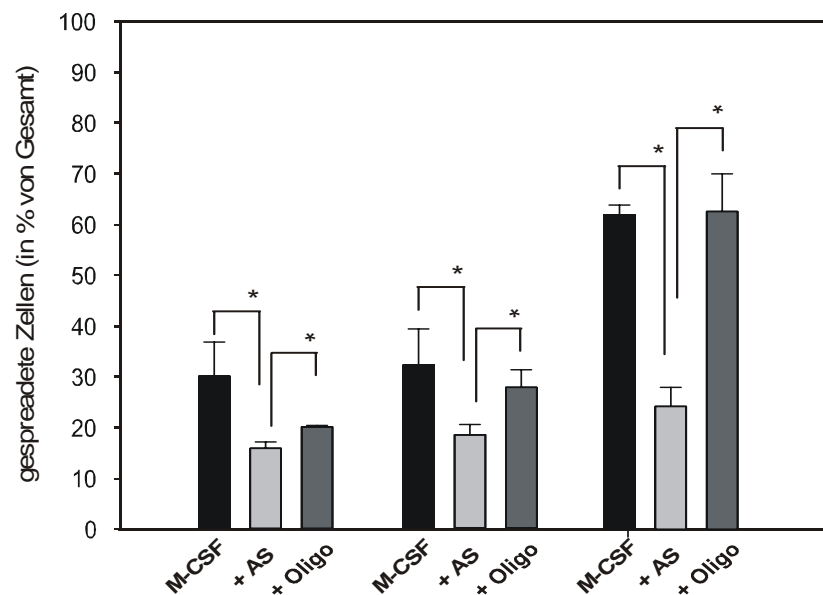


Abb. 25: Einfluss der CDC42-AS auf das M-CSF induzierte Spreading.

Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm AS- und Random-Oligonukleotide kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die quantitativen Auswertungen von zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte sind in % der gespreadeten Monozyten von der gezählten Gesamt-Zellzahl angegeben (* $p < 0.05$).

Die CDC42-Antisense reduzierte das M-CSF-induzierte Zellspreading signifikant. Mit Ausnahme von Tag1 hatte das Random-Oligonukleotid keinen Einfluss auf das Spreading. Quantitativ lässt sich in Bezug auf die Kontrolle bei der AS-Stimulation eine Reduktion im Spreading-Verhalten auf 54,3% am Tag1, auf 58,5% am Tag2 und auf 39,0% am Tag3 bestimmen. Dieses Ergebnis machte deutlich, dass CDC42 einen direkten Einfluss auf das monozytäre Zellspreading besitzt.

4.3. Untersuchungen zum Spreading- und Adhärenz-Verhalten ABCA1-defizienter Monozyten

Die bisher dargestellten Untersuchungen sprechen dafür, dass die apo AI-vermittelte Hemmung des Zellsreadings und der Zellmigration auf einer Induktion des zellulären Cholesterinefflux beruhen. Der ATP-binding cassette transporter ABCA1 ist der zentrale Regulator dieses Prozesses. ABCA1 defiziente Zellen von Patienten mit der Tangier Erkrankung, bzw. ABCA1 knock-out Mäusen, zeigen keinen apo AI-vermittelten Cholesterinefflux. Deshalb sollte unter Verwendung von Tangier Monozyten die Bedeutung des apo AI/ABCA1-Pathways in der Regulation des Zellsreadings weiter untersucht werden.

In diesem Abschnitt sollte neben dem Vergleich des M-CSF-induzierten Spreading- und Adhärenzverhaltens auch der Einfluss von apo AI und HDL₃ auf dieses von Kontroll- und Tangiermonozyten untersucht werden. Zudem wurde der Einfluss dieser Lipoproteine auf den Differenzierungsstatus der Tangier Monozyten untersucht. Später wurden die Expressionsuntersuchungen des CDC42-Proteins angeschlossen.

4.3.1. Einfluss von HDL₃ und apo AI auf das M-CSF-induzierte Spreading von Tangier-Monozyten

Um den Einfluss von HDL₃ und apo AI auf das M-CSF-induzierte Spreading bei Tangier-Monozyten zu analysieren, wurden Zellen von zwei unterschiedlichen Patienten untersucht.

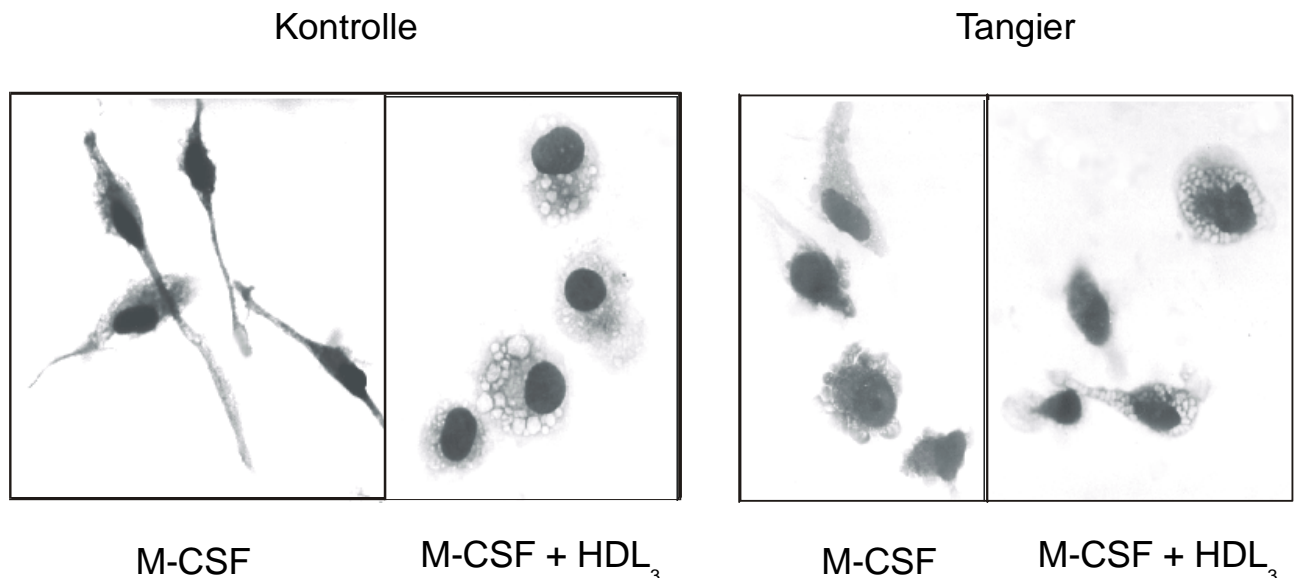


Abb. 26 Einfluss von HDL₃ auf das M-CSF induzierte Spreading bei Tangier Monozyten.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kontroll- und Tangiermonozyten am Tag3 der *in-vitro* Kultur. Es wurden nebeneinander Monozyten der M-CSF-Kultur und der M-CSF-Kultur+HDL₃ dargestellt.

Wie man erkennen kann, war das M-CSF-induzierte Spreading bei Tangiermonozyten gegenüber den Kontrollzellen reduziert. Dieses verminderte Spreading war vorherrschend in der frühen Phase der Differenzierung.

Der bereits erniedrigte Anteil ausgebreiteter Zellen wurde zudem durch die HDL₃-Inkubation nicht weiter vermindert.

Quantitativ gibt die folgende Abbildung Aufschluss darüber.

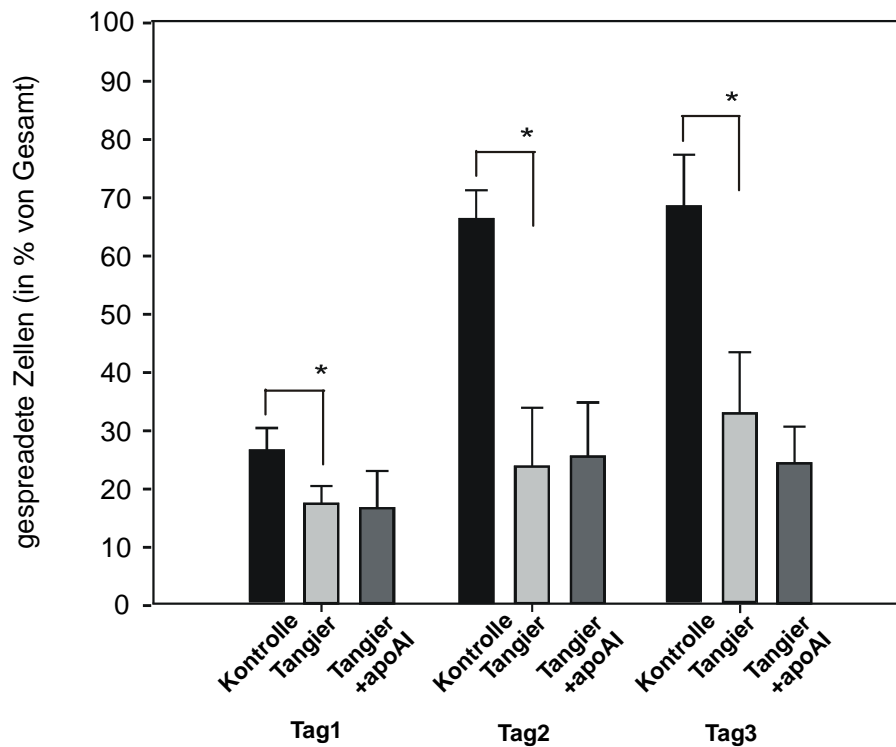


Abb. 27: M-CSF induziertes Spreading und Einfluß von apo AI bei Tangier-Monozyten.

Tangier- und Kontrollmonozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm apo AI kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die quantitativen Auswertungen von zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte sind in % der gespreadeten Monozyten von der gezählten Gesamt-Zellzahl angegeben (* $p < 0.05$).

Quantitativ ließ sich eine signifikante Verminderung des M-CSF-induzierten Zellsreadings bei Tangier gegenüber den Kontrollen um $8,7\% \pm 3\%$ am Tag1, um $42,5\% \pm 10,1\%$ am Tag2 und für Tag3 um $35,3\% \pm 10,5\%$ errechnen.

Die Untersuchungen des Spreadings in Kontrollmonozyten legten eine funktionelle Beziehung zwischen dem HDL₃, oder apoA-I-vermittelten Cholesterin-Efflux, und der Inhibition des Zellsreadings nahe. Im Einklang damit steht, dass in Tangier-Monozyten apoA-I keine weitere Inhibition des Zellsreadings bewirken konnte. Darüber hinaus war das MCSF-induzierte Spreading der Tangier-Monozyten reduziert, was, wie später dokumentiert, im funktionellen Zusammenhang mit der fehlenden Induktion der CDC42-Protein-Expression während der Monozyten-Differenzierung in Tangier steht.

4.3.2. Effekt von M-CSF auf die Expression der Oberflächen-Antigene von Tangier-Monozyten

Auch in Tangier-Monozyten wurde die Expression der β_2 -Integrine (CD11b, CD11c) und der β_1 -Integrine (CD49d, CD49e), der Scavenger Rezeptoren CD163 und CD36 und auch des Fc γ -IIIa-Rezeptors (CD16) während der M-CSF-induzierten Differenzierung signifikant hochreguliert. Das Ausmaß der Hochregulation wird quantitativ in Tabelle 7 dargestellt.

Monozyten	Kontrollen	Tangier	
	M-CSF (n=8) (% vom Tag1)	M-CSF (n=2) (% vom Tag1)	Signifikanz
β_2-Integrine			
CD11a	154,3 \pm 33	92,5 \pm 10,3	$p = 0.13$
CD11b	209,9 \pm 61,8	141,1 \pm 54,6	$p = 0.13$
CD11c	189,9 \pm 41,1	170,2 \pm 16,3	$*p = 0.0008$
β_1-Integrine			
CD49d	291,1 \pm 160,5	217,4 \pm 142,4	$p = 0.11$
CD49e	438,5 \pm 173,2	312 \pm 67,4	$*p = 0.002$
Scavenger Rezeptoren			
CD163	1692,5 \pm 1876,3	858,7 \pm 551,7	$p = 0.09$
CD36	484,6 \pm 226,3	238,6 \pm 191,7	$p = 0.13$
FcγIIIaR			
CD16	154,3 \pm 33	388,9 \pm 158	$*p = 0.016$

Tabelle 7: Effekt von M-CSF auf die Expression von Oberflächen-Antigene in Kontroll- und Tangiermonozyten am Tag3 (% von Tag1).

Monozyten wurden in M-CSF supplementierten Medium für 3 Tage kultiviert. Die Expression der Oberflächen-Antigene werden in % vom Tag1 (Ausgangswert) errechnet. Statistische Signifikanz wird mit *p angegeben.

Die Expression der β_2 -Integrine (mit Ausnahme von CD11a) und β_1 -Integrine stieg von Tag1 zum Tag3 zwischen ca. 140% und 300% an. Ebenfalls die Expression der Scavenger Rezeptoren CD163 und CD36 erfuhr eine Hochregulation. Der Fc γ -IIIaR (CD16) erfuhr eine Hochregulation von ca. 380%. Im Vergleich zu den Kontrollen war in Tangier die Hochregulation der Integrin-Expression weniger deutlich ausgeprägt. Wichtig in diesem Zusammenhang war, dass die Expression der β_2 -Integrine vergleichend zur Kontrolle eine Verminderung von ca. 40% für CD11a, eine von ca.

30% für CD11b, eine von ca. 10% für CD11c errechnet wurde. Die β_1 -Integrine erfuhren eine Verminderung von rund 25%. Diese Verminderung der Adhäsionsmoleküle in Tangiermonozyten könnte im Zusammenhang mit der verminderten M-CSF-induzierten Spreading-Antwort der Tangier-Monozyten stehen. Auffallend war, dass auch die Scavenger Rezeptoren CD163 und CD36 bei den beiden Tangier-Patienten eine um 50% verminderte Expression im Vergleich zu den Kontrollen zeigten. Im Gegensatz dazu lag die CD16-Expression deutlich höher.

4.3.3. Einfluss von HDL₃, apo AI und E-LDL auf die Expression der Oberflächen-Antigene in Tangier-Monozyten

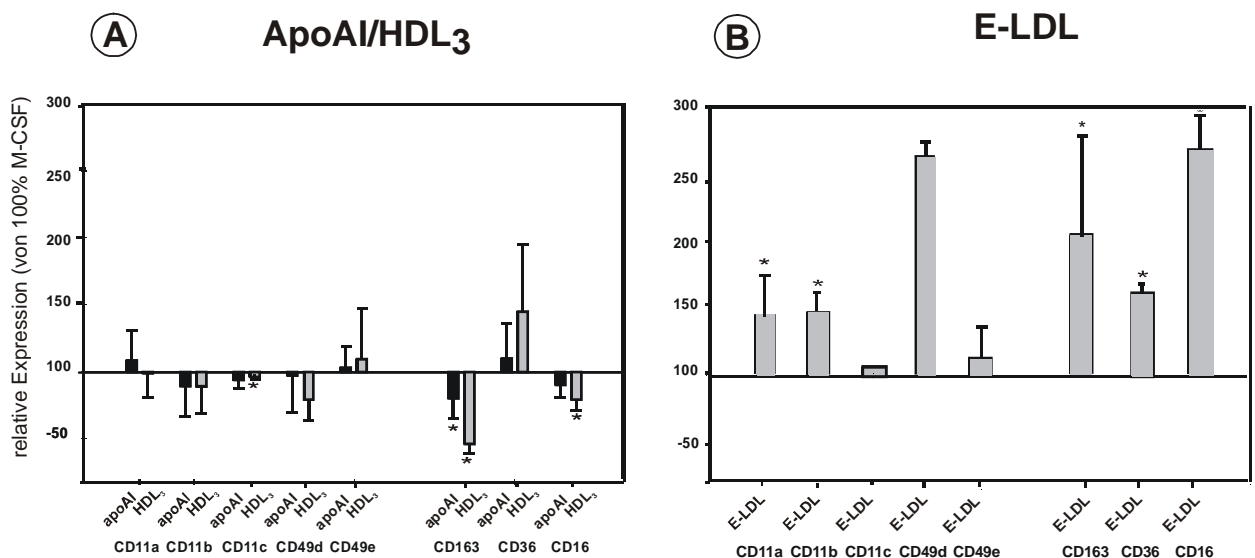


Abb. 28: Einfluss von HDL₃, apo AI und E-LDL auf die M-CSF-induzierte Expression der Oberflächen-Antigene in Tangier-Monozyten.

Tangiermonozyten wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen in M-CSF supplementierten Medium \pm 100 μ g/mL HDL₃, 10 μ g/mL apo AI und 40 μ g/mL E-LDL kultiviert. Die Mittelwerte \pm SD zeigen die Auswertungen von n=5 für apo AI, n=4 für HDL₃ und n=4 für E-LDL. Die relative Expression in % von M-CSF wird angegeben (*p < 0.05, **p < 0.005).

Im Vergleich zu den Kontrollen war eine Regulation der Integrin-Expression in Tangier Monozyten durch HDL₃ und apo AI nicht deutlich zu erkennen. Allerdings wurde auch hier die Expression von CD163 und CD16 durch diese Agonisten stark beeinflusst. Insbesondere die CD163-Expression wurde signifikant durch HDL₃ und apo AI vermindert. Die Cholesterin-Beladung mit E-LDL hatte einen mehr oder weniger deutlichen Effekt auf die Expression der Oberflächen-Antigene. Die β_2 -Integrine CD11a und CD11b wurden signifikant um ca. 40% hochreguliert. Hingegen erfuhr CD11c durch

E-LDL keine Modulation. Bei den β_1 -Integrinen machte sich die Cholesterin-Beladung bei der Expression von CD49d deutlich bemerkbar. Die Hochregulation der Scavenger-Rezeptoren CD163 und CD36 und des Fc γ -IIIaR (CD16) durch E-LDL war quantitativ mit derjenigen in den Kontrollen vergleichbar.

Es fiel auf, dass die Antigene, die auch durch den Cholesterinefflux signifikant reguliert wurden, ebenfalls eine deutliche Regulation durch E-LDL erfuhren.

4.3.4. CDC42-Expression in Tangier-Monozyten

In Kontrollmonozyten fand eine eindeutige Induktion der CDC42-Expression während der Kultur in M-CSF haltigem Medium statt. Basierend auf dem verminderten Spreadingverhalten der Tangier-Monozyten stellte sich die Frage nach einer möglichen aberanten Expression des CDC42-Prozeins in diesen Zellen. Von einem Patienten (TD3) standen regelmäßig frisch isolierte Monozyten zur Verfügung. Von diesem Patienten konnte zweimal Proben-Material, während von einem anderen Patienten (TD2) konnte nur einmal Material zur Proteinreinigung abgesammelt werden konnte. Von beiden Patienten wurde die CDC42-Expression während einer dreitägigen *in-vitro*-Kultur analysiert.

4.3.4.1. M-CSF-induzierte CDC42-Expression in Tangiermonozyten

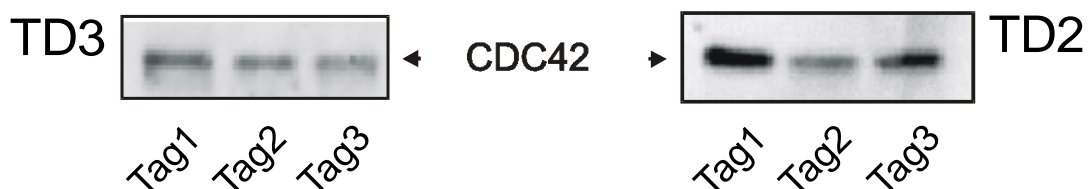


Abb. 29: CDC42-Expression während der M-CSF Differenzierung in Tangiermonozyten.

Jeweils 20 μ g Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben am Tag1, Tag2 und Tag3 von zwei Tangier-Patienten aufgetragen.

In Tangier-Monozyten konnte eine fehlende Induktion der CDC42-Expression während der M-CSF-stimulierten Differenzierung beobachtet werden. Hingegen war es so, dass vergleichend mit dem Tag 2 und 3 der Monozyten-Differenzierung das CDC42-Protein basal am Tag1 höher exprimiert war.

4.3.4.2. CDC42-Expression am Tag2 der Monozyten-Differenzierung

Da im Vergleich zu den Kontrollen, die CDC42-Expression in Tangier-Monozyten verändert vorlag, wurde ein Vergleich zwischen Tangier und Kontrollen am Tag2 der *in vitro*-Kultur analysiert.

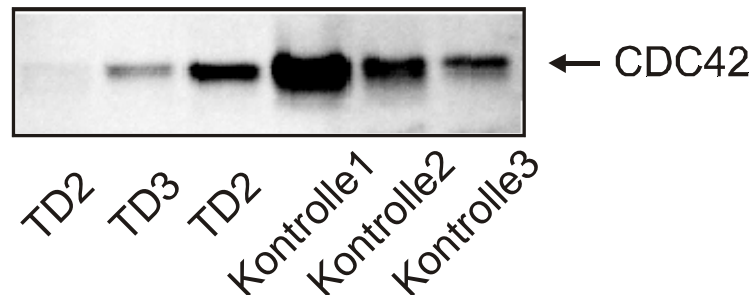


Abb.30: CDC42-Expression während der M-CSF Differenzierung zwischen Tangier- und Kontrollmonozyten.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben vom Tag2 von zwei Tangier-Patienten und drei Kontrollen aufgetragen.

Am Tag2 der Monozyten-Differenzierung lag die CDC42-Expression in den Kontrollen im Vergleich zu den Tangier-Monozyten im Mittel höher. Wurden die Einzelwerte betrachtet, war CDC42 in einem zweiten Ansatz bei TD2 im Vergleich zur Kontrolle 3 höher exprimiert. Die quantitative Auswertung gibt Aufschluss darüber.

Tangier			Normal		
TD2	TD3	TD2	Normal1	Normal2	Normal3
66,1	200,5	942,4	3400	972	629

Tab. 8: Quantitative Auswertung der Western Blot-Analyse.

Es wurden jeweils die absolut OD-Werte der Lumi-Imager-Auswertung vom Tag2 der CDC42-Expression zwischen zwei Tangier-Patienten und drei Kontrollen gezeigt.

4.3.4.3. Flow-Zytometrischer Nachweis der intrazellulären CDC42-Expression während der M-CSF-induzierten Differenzierung zwischen Tangier- und Kontrollmonozyten

Die Monozyten wurden 5 Tage mit M-CSF differenziert und die Expression am Tag0, Tag1, Tag2 und Tag3 zwischen Tangier- und Kontroll Monozyten bestimmt.

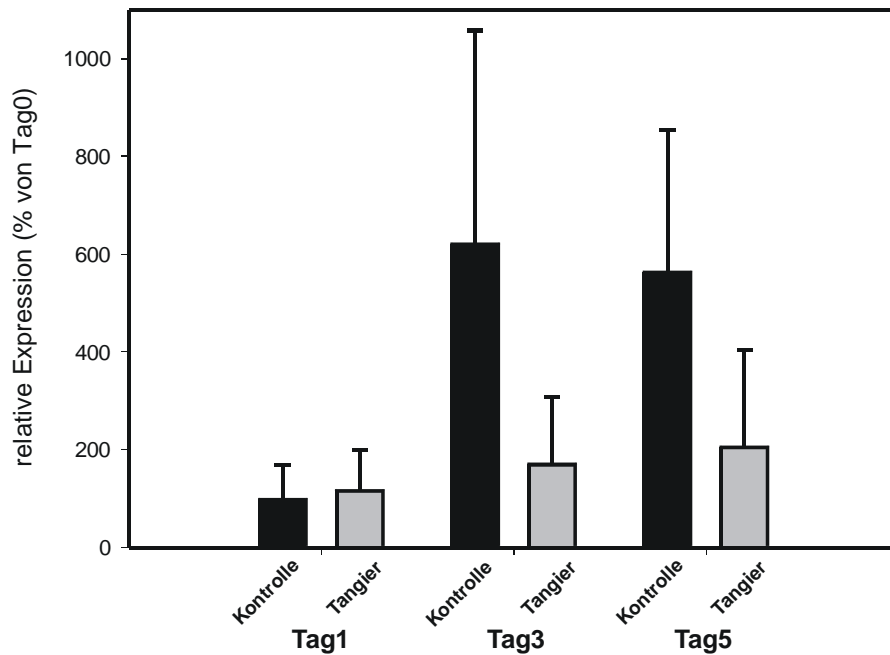


Abb. 31: M-CSF-induzierte CDC42-Expression in Tangier- und Kontrollmonozyten.

Die Daten repräsentieren die relative CDC42-Expression in % von Tag0 zwischen Tangier- (schwarze Balken) und Kontrollmonozyten (graue Balken). Die Mittelwerte stellen die quantitative Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten bei Tangier und von 7 unabhängigen Experimenten bei den Kontrollen dar.

Insgesamt stieg die CDC42-Expression vom Tag0 (2h nach Aussaat) bis zum Tag5 an. Im Gegensatz zur deutlichen Hochregulation der CDC42-Expression in differenzierten Kontroll-Monozyten, zeigte sich analog zu den Western-Blot Ergebnissen keine signifikante Induktion der CDC42-Expression in Tangier-Monozyten. Die CDC42-Expression bei den Kontrollen war am Tag3 am höchsten, es fand eine Steigerung auf 600% statt. Im Gegensatz dazu stieg die Expression in Tangier Monozyten nur um rund 200% am Tag5 an.

4.3.5. Regulation der CDC42-Expression durch Ceramid

In Tangierfibroblasten wurde ein erhöhter Gehalt an Ceramid gefunden [Robenek and Schmitz (1991); Drobnik et al. (1999)]. Ceramid gilt als negativer Regulator des Zellwachstums und der PLD. Da in Tangier sowohl das Zellwachstum, das Spreading und die CDC42-Expression vermindert waren, bzw. einer Dysregulation unterlagen, könnte ein möglicher Bezug zum erhöhten Ceramid-Gehalt in Tangier-Zellen hergestellt werden. Diesbezüglich sollte die Regulation der CDC42-Expression durch Ceramid untersucht werden.

Hierfür wurden die Zellen für 24h am Tag1 und am Tag4 mit 150µg/mL Medium Zellmembran permeablen, kurzkettigen C2-Ceramid stimuliert.

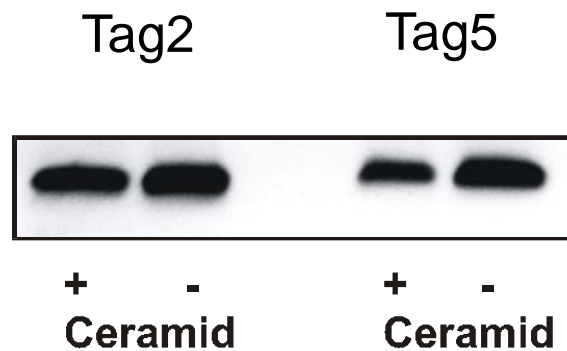


Abb.32: CDC42-Expression nach Ceramid-Stimulation am Tag2 und Tag5.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein des Zellhomogenats wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Proben am Tag2 und Tag5 ± Ceramid aufgetragen

Die Expression von CDC42 wurde durch die Ceramid-Stimulation supprimiert. Sowohl am Tag2 als auch am Tag5 kommt es zu einer Reduktion der Expression von im Mittel 40%.

4.4. Expression und Regulation von CDC42 und interagierenden Proteine in humanen Fibroblasten

Neben den Untersuchungen in Monozyten, wurden parallel in Fibroblasten Expressionsuntersuchungen des in Monozyten durch HDL₃ und apo AI regulierten Proteins CDC42 vorgenommen. Hier wurde CDC42 als Regulatorprotein in der Zytoskelett-Organisation identifiziert. Weiter konnte durch die vergleichenden Untersuchungen an Kontroll- und Tangier-Monozyten eine abnormale M-CSF-induzierte CDC42-Expression in Tangier beobachtet werden, die mit einer verminderten Spreading-Antwort korrelierte. Die Untersuchungen in Kontrollmonozyten legten nahe, dass der HDL₃ und apo AI-vermittelte Cholesterin-Efflux in die Inhibition des Zell-Spreading involviert ist. Gerade dieser Efflux ist im HDL-Defizienz-Syndrom der Tangier-Erkrankung auf den Basallevel reduziert. Diese spezifische Reduktion ist assoziiert mit der gestörten ABCA1-Funktion. Um diese Assoziation weiter zu charakterisieren, wurden vergleichende Untersuchungen zwischen Tangier und Kontrollen in Fibroblasten durchgeführt.

Neben CDC42 wurde IQGAP, welches als GAP-Protein für CDC42 bekannt und mit diesem zusammen im vesikulären Lipid- und Protein-Transport beteiligt ist, charakterisiert.

4.4.1. Einfluss von HDL₃ und apo AI auf die Expression von CDC42 in Tangier- und Normal-Fibroblasten

Die Stimulation mit den Lipoproteinen verlief alternierend zwischen HDL₃ und apo AI. Die Fibroblasten wuchsen bis zur Konfluenz in FCS-haltigem Medium und wurden mit 0.5% BSA supplementiertem Medium für 24h synchronisiert. Die Stimulation erfolgte entweder mit 100 µg/mL HDL₃ oder mit 10µg/mL apo AI für weitere 24h. Nach dem Waschen wurden die Zellen direkt in GTC-Lösung lysiert.

4.4.1.1. RNA-Expression von CDC42

Für die Stimulationen mit HDL₃ wurden die Zellen für 24h synchronisiert und für weitere 12h bzw. 48h mit 100µg/mL HDL₃ inkubiert. Für den Basalvergleich der Expression zwischen Tangier- und Normalfibroblasten wuchsen die Zellen in FCS-haltigem Medium bis zur Konfluenz und wurden direkt in GTC-Lösung lysiert.

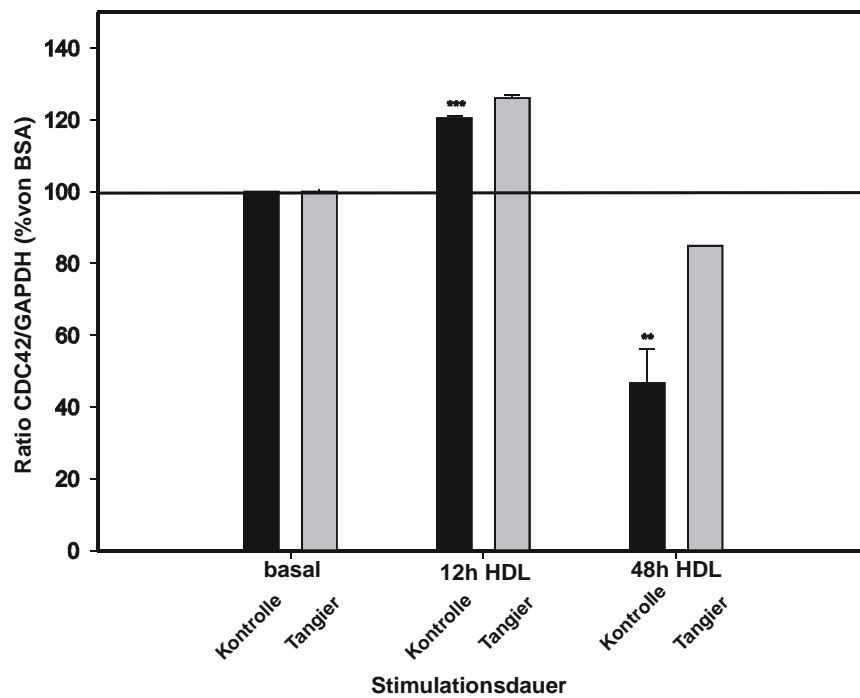


Abb.33: m-RNA-Expression von CDC42 nach HDL₃-Stimulation zwischen Tangier- und Normalfibroblasten.

Das Formaldehyd-Gel wurde mit 10µg RNA bestückt. Die Autoradiographie wurde 24h exponiert. Es wurden Kontrollproben (schwarze Balken, n=3) und eine Tangier-Probe (graue Balken) analysiert. Die OD-Werte der CDC42- und GAPDH-Bande wurden mit Image Quant quantifiziert und das Verhältnis des CDC42-zum GAPDH-Wert gebildet. Die Werte wurden in % vom Basal-BSA-Wert(100%) angegeben.

In der Northern Blot-Analyse wurde für CDC42 ein spezifisches Hybridisierungssignal bei ca. 1,9 kb detektiert. In den Kontrollproben wurde nach 12h HDL₃-Stimulation ein Anstieg in der Expression des m-RNA-Levels um $21\% \pm 0,71$ beobachtet. Dieser Anstieg ließ sich nach längerer HDL₃-Inkubation nicht weiter verfolgen. Im Gegenteil, die Expression nahm nach 48h Inkubation, verglichen zum Basalwert, um $53\% \pm 9,4$ ab. Die Regulation durch HDL₃ war in beiden Fällen signifikant.

Bei der Tangierprobe (T1) wurde ebenfalls eine erhöhte Expression nach HDL₃-Inkubation beobachtet. Der spätere Abfall nach 48h HDL₃-Stimulation lag im Vergleich zur Kontrolle bei 15%.

4.4.1.2. Proteinexpression von CDC42

Wie die Northern Blot-Analyse gezeigt hatte, unterlag CDC42 einer Regulation durch HDL₃. Diese Regulation sollte auf Western-Blot-Ebene im Tangier-Normal-Vergleich verifiziert werden. Für die Stimulationen mit HDL₃ wurden die konfluent gewachsenen Zellen für 24h auf Medium+0.5% BSA synchronisiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte für weitere 12h bzw. 18h mit 100µg/mL HDL₃.

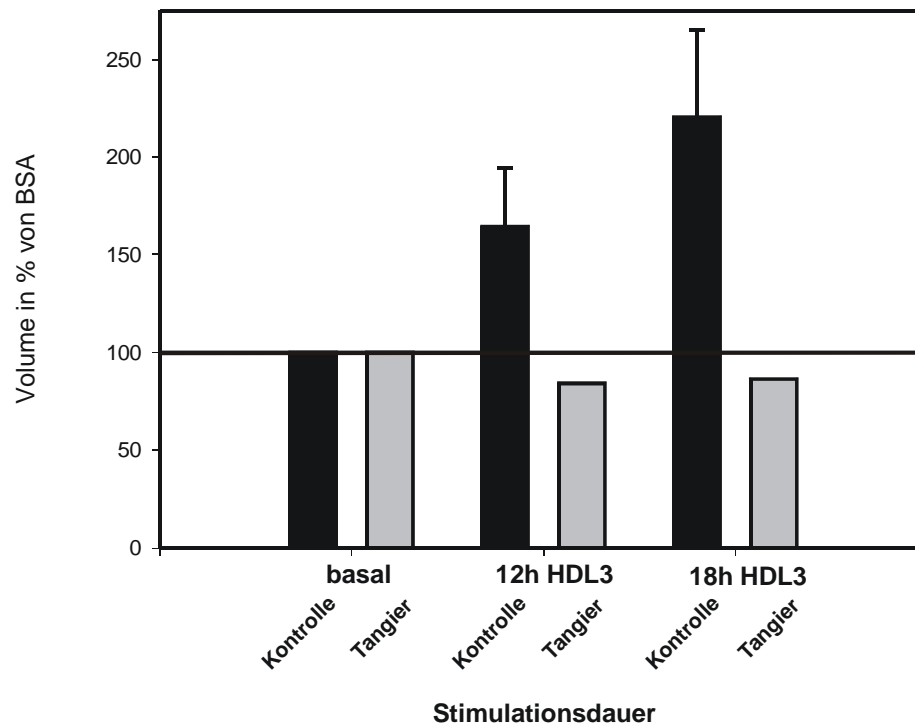


Abb.34: Regulation der CDC42-Proteinexpression nach HDL₃-Stimulation in Tangier- und Normalfibroblasten.

Die Mittelwerte stellen die quantitative Auswertung der Normalprobanden (n=3, schwarze Balken) dar. Die grauen Balken zeigen die Expression des Tangierpatienten (T1). Die Werte sind in Prozent des BSA-Wertes errechnet. Es wurden 40 µg Gesamtprotein des Zellhomogenats auf einem 12% SDS-Page aufgetrennt.

Die Gesamtexpression von CDC42 wurde in Kontroll-Fibroblasten nach 12h HDL₃-Stimulation hochreguliert. Diese Hochregulation wurde nach 18h HDL₃-Stimulation noch verstärkt. Somit wurde die Induktion der Expression von CDC42, die nach der Kurzzeitstimulation mit HDL₃ auf RNA-Ebene beobachtet wurde, hier bestätigt. In Tangierfibroblasten unterlag CDC42 keiner Regulation.

4.4.2. Basale Proteinexpression von CDC 42 in Tangier- und Normal-Fibroblasten

Aufgrund der eindeutigen Lipoprotein-abhängigen Regulation der CDC42-Expression in Kontrollfibroblasten, wurde die basale Expression von CDC42 untersucht.

4.4.2.1. Basalvergleich der Expression von CDC42

Mit polyklonalen Antikörpern (Santa Cruz) konnte in Fibroblasten für CDC42 ein spezifisches Signal bei ca. 23 kDa detektiert werden.

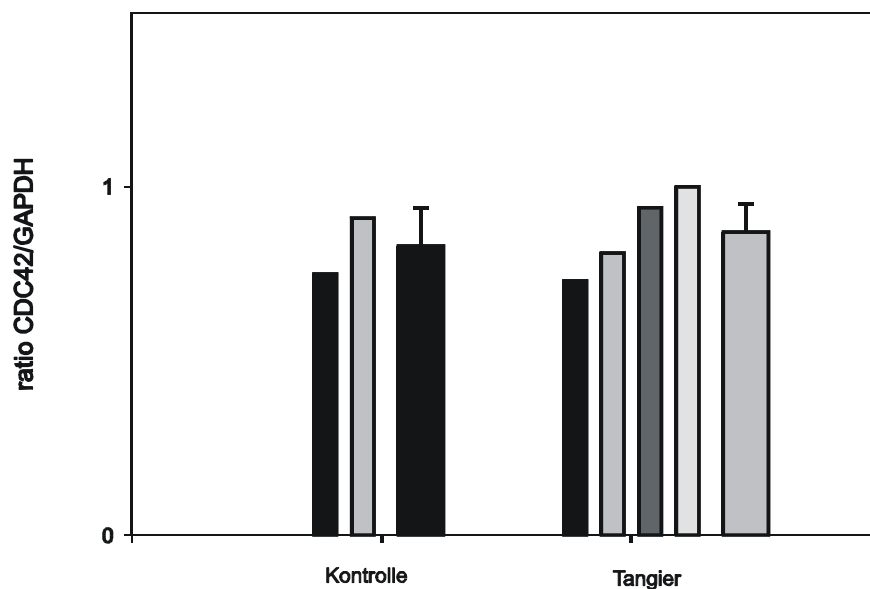


Abb.35: Basale Expression der CDC42-m-RNA in Tangier- und Kontrollfibroblasten.

Die Zellen wurden wie beschrieben aufgearbeitet und das Formaldehyd-Gel mit 10µg Total-RNA bestückt. Die Autoradiographie wurde 24h exponiert. Es wurden nebeneinander Kontrollproben (N1/N2) und Tangier-Proben (T1/T2/T3/T4) analysiert. Die Absolutwerte der CDC42- und GAPDH-Bande wurden mit Image Quant quantifiziert und das Verhältnis des CDC42-Wertes zum GAPDH-Wert gebildet.

Wie auf der Abb.35 zu erkennen ist, bestand in der Basal-Expression des m-RNA-Levels zwischen Normal- und Tangierfibroblasten kein Unterschied. Der Mittelwert der Expression betrug in Normalfibroblasten (n=2) 0.83 ± 0.11 und für Tangierfibroblasten (n=4) bei 0.87 ± 0.12 .

Da bei den Mitgliedern der Familie kleiner GTP-bindender Proteine die Veränderung in der subzellulären Verteilung ein Zeichen ihrer Aktivität darstellt, wurde die Anreicherung des Protein im Zytosol und der Membranfraktionen analysiert. Die Akkumulation in der Membranfraktion stellt den aktiven intrazellulären Pool dieser Proteine dar.

Zudem vermehrten sich in der Arbeitsgruppe Hinweise, dafür dass der Lipoprotein-induzierte Cholesterinefflux an spezifische Plasmamembran-Mikrodomänen gebunden ist. Aus eigenen Ergebnissen war bekannt, dass in Monozyten CDC42 an der Bildung

von Membranprotrusionen beteiligt ist, die ebenfalls spezifische Plasmamembranbereiche darstellen.

Untersuchungen über die Verteilung der CDC42-Expression in verschiedene zelluläre Kompartimente sollten weiteren Aufschluss geben.

4.4.2.2. Verteilung der CDC42-Expression zwischen Zytosol und Gesamtmembran im Vergleich zwischen Tangier- und Kontrollfibroblasten

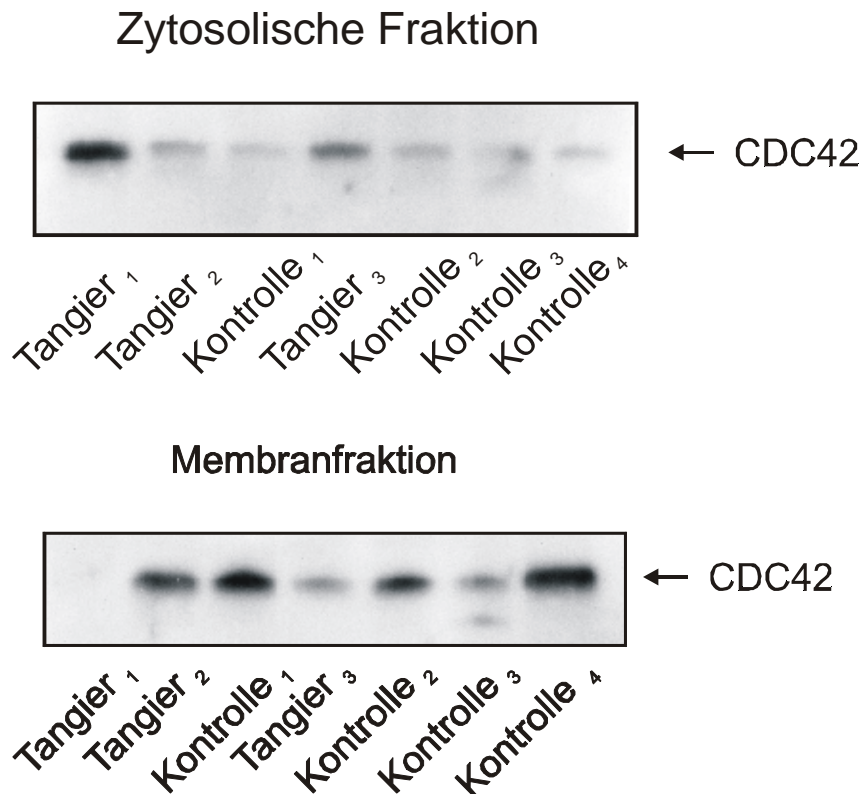


Abb.36: Basale Verteilung von CDC42 zwischen Zytosol und Gesamtmembran.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein der in UZ getrennten zytosolischen- und Membranfraktion wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Tangier-Proben (T1/T2/T3) und Kontrollproben (N1/N2/N3/N4) aufgetragen.

Zu erkennen war, dass bei den Tangier-Proben eine Akkumulation in der zytosolischen Fraktion, hingegen in den Kontrollproben eine Anreicherung in der Membranfraktion stattfand. Auffallend war bei einer Tangier-Probe (T1), dass eine ausschließlich zytosolische Fraktion des CDC42-Proteins vorlag. Dies wies auf eine Inaktivität des Proteins unter diesen Bedingungen hin. Auf der anderen Seite lag bei den Kontrollen N1, N2, N3 eine Verteilung von ca. 80% zu 20% zugunsten der Membranfraktion vor. Das CDC42-Protein lag hier in einer überwiegend aktivierten, Membrangebundenen Form vor. Eine quantitative Auswertung über die Mittelwerte der Verteilung zeigt die Abb. 37.

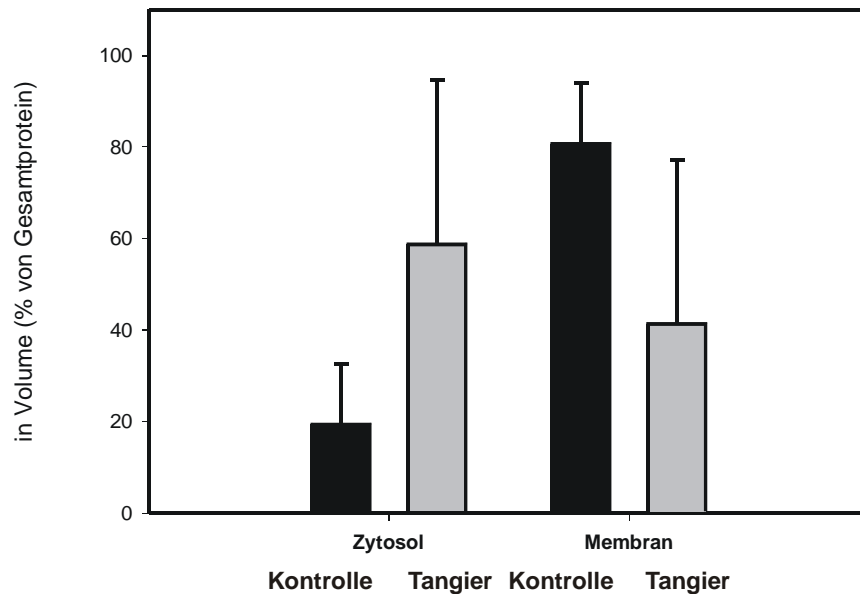


Abb.37 Basale Verteilung zwischen Zytosol und Gesamtmembran bei Tangier und Kontrolle.

Die Mittelwerte stellen die quantitative Auswertung der oben gezeigten Blots dar, Tangier (n=3) und Kontrolle (n=4). Dargestellt sind die OD-Werte der Image-Quant-Auswertung in % des Gesamtproteins.

Die Darstellung der quantitativen Auswertung zeigte deutlich eine Umverteilung zwischen Zytosol- und Membranfraktion im Vergleich zwischen Tangier- und Kontrollfibroblasten. Allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Die OD-Werte für das Gesamtprotein bei Tangier und Normal lagen in gleicher Größenordnung vor.

4.4.2.3. CDC42 in der Subfraktionierung

Um dem Sachverhalt näher zu verifizieren, dass zwischen Tangier und Normal eine Umverteilung zwischen Zytosol und Gesamtmembranfraktion vorlag, wurde eine Subfraktionierung in verschiedene schwere Membranfraktionen, die später vom Zytosol abgetrennt wurden, vorgenommen. Die Anreicherung der Membranfraktionen in die verschiedenen Kompartiment-Fraktionen wurde mittels Markerenzymen überprüft. Zudem wurden die Fraktionen mit einem β -COP-Antikörper auf Verunreinigungen innerhalb der Membranfraktionen getestet. β -COP ist ein spezifischer Marker für die Golgifraktion. Diese Fraktion enthält somit intrazelluläre Membrane und die Golgi-Membran. Durch die hier angewandte Subfraktionierung war eine vollständige Trennung der verschiedenen intrazellulären Kompartimente nicht möglich. Es wurden ausnahmslos mit spezifischen Membranen angereicherte Fraktionen erhalten. Im Folgenden werden 4 Fraktionen beschrieben, die als Zytosol (Zyt), intrazelluläre Membran-Fraktion (IM), Plasmamembran-Fraktion (PM) und lysosomale Membranfraktion (Lys) bezeichnet werden.

Die quantitative Verteilung des CDC42-Proteins im Tangier-Kontroll-Vergleich zeigt die folgende Abbildung.

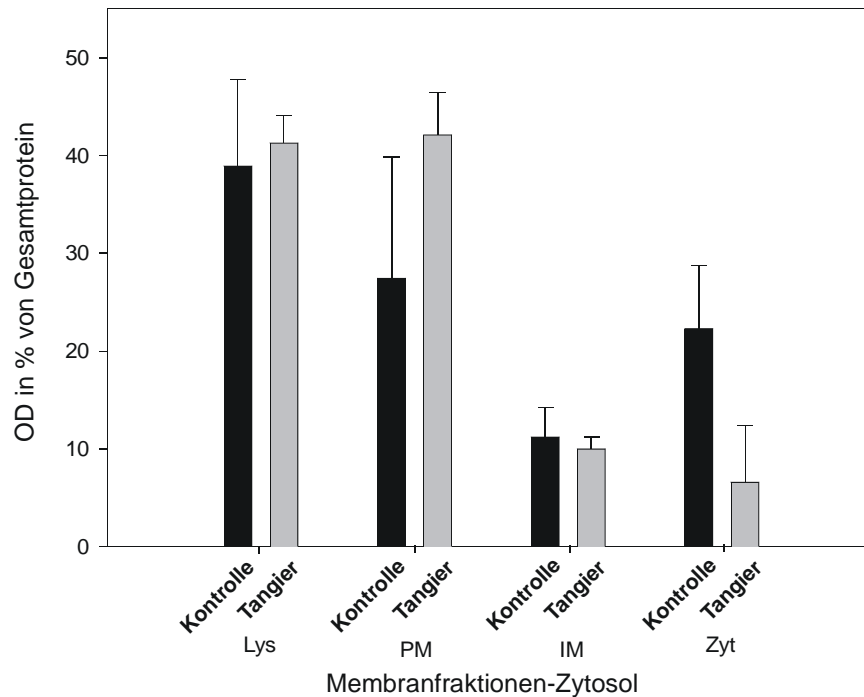


Abb.38 Verteilung von CDC42 in der Subfraktionierung zwischen Tangier und Kontrolle.

Die Mittelwerte stellen die quantitative Auswertung von zwei unabhängigen Subfraktionierungen, Tangier (n=2, graue Balken) und Kontrolle (n=2, schwarze Balken) dar. Dargestellt sind die %-Werte der Verteilungen innerhalb der Membranfraktionen und dem Zytosol bezogen auf das Gesamtprotein.

Exemplarisch für die Subfraktionierungen wird ein Western-Blot einer der unabhängigen Präparationen vorgestellt.

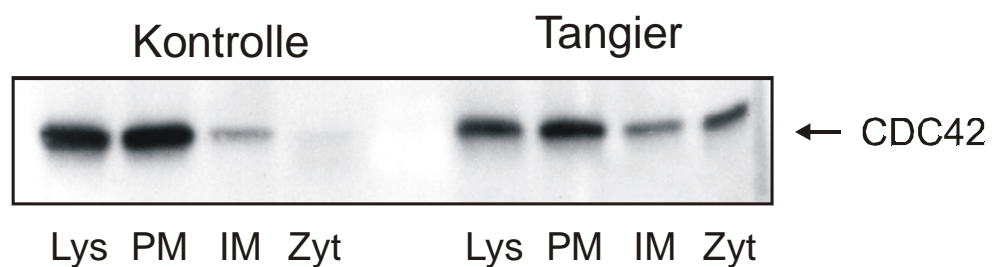


Abb.39: Western Blot-Analyse von CDC42 in der Subfraktionierung.

Jeweils 40µg Gesamt-Protein der in UZ getrennten intrazellulären Fraktionen wurden auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander die Fraktionen eines Kontroll- und eines Tangierprobanden aufgetragen.

Die quantitative Auswertung der Subfraktionierungen bestätigten eine intrazelluläre Umverteilung von CDC42 in Tangier- und Kontrollfibroblasten. In der Tangierprobe vollzog sich die Umverteilung zugunsten der intrazellulären Fraktion und der zytosolischen Fraktion. In der Kontroll-Probe lag CDC42 ausschließlich membrangebunden vor.

4.4.3. Expression von IQGAP

Das IQGAP-Protein ist das GAP-Protein (GTPase-Activating-Protein) von CDC42, welches direkt mit CDC42 interagiert und es in die aktive Form überführt. Für beide Proteine konnte eine Beteiligung im Protein- und Cholesterin-Transport vom Golgi zur Plasmamembran nachgewiesen werden.

4.4.3.1. IQGAP im Basalvergleich zwischen Tangier und Kontrolle

Analog zu den Expressionsuntersuchungen des CDC42-Proteins wurden für das IQGAP-Protein sowohl basale Expressionen als auch die Verteilung des Proteins zwischen den zellulären Subfraktionen ermittelt.



Abb.40: Western Blot-Analyse von IQGAP zwischen Tangier-und Kontrollfibroblasten.

Jeweils 80µg Gesamt-Protein eines Gesamt-Zellextraktes wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander Tangier-Proben (T1/T2/T3/T4/T5/T6) und Kontrollproben (N1/N2) aufgetragen.

Die basale Expression im Tangier Fibroblasten lag im Mittel ca. 400 % höher als im Kontrollfibroblasten. Allerdings war die Expression innerhalb der Tangierpatienten sehr inhomogen.

4.4.3.2. IQGAP in der Subfraktionierung zwischen Tangier und Kontrolle

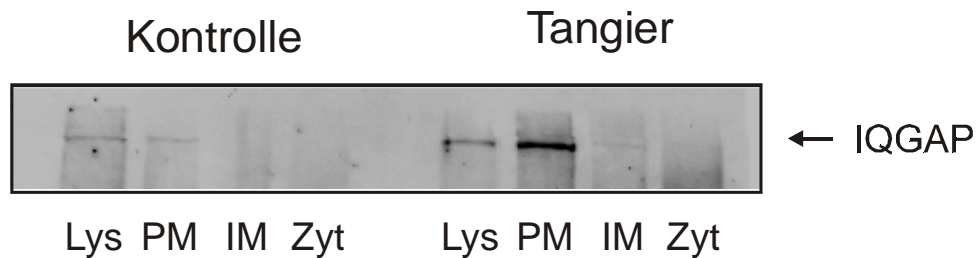


Abb.41: Western Blot-Analyse von IQGAP in der Subfraktionierung.

Jeweils 20µg Gesamt-Protein der in UZ getrennten intrazellulären Fraktionen wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Es wurden nebeneinander die Fraktionen eines Kontroll- und eines Tangierprobanden aufgetragen.

Auch in der Subfraktionierung (Abb. 41) lag der Gesamt-Proteinanteil bei Tangier höher als im Kontrollprobanden. Auffallend war, dass der Hauptanteil bei Tangier in der Plasmamembran-Fraktion angereichert war, wohingegen beim Kontrollprobanden das Protein zwischen der lysosomalen Fraktion und der PM annähernd gleich verteilt erschien.

4.4.4. Anreicherung von β -COP als spezifischer Marker für die Golgimembran

β -COP ist eine Untereinheit des Coatomer-Komplex, der am Golgi gebildet wird. Der Coatomer ist ein zunächst zytosolischer Komplex, aus dem mit verschiedenen anderen „Coat“-Proteinen (COPs) ein „Coat“ geformt wird. Der „Coat“ ist die Hüllmembran eines Vesikels. COP-coated Vesikel sind zuerst als Vesikel identifiziert worden, die zwischen den Subkompartimenten des Golgi am Transport von Proteinen beteiligt sind. Später konnte auch die Beteiligung dieser Vesikel am Protein-Transport zwischen ER und Golgi postuliert werden. Die Vesikel-Formation aus Untereinheiten findet am Golgi selbst statt und wird initiiert durch die Bindung von AFR-GTP an den Golgi. Jetzt wird der Vesikel aufgebaut, es kommt zum Budding-Prozeß. Als Untereinheit eines Golgi-Vesikels, soll β -COP hier als Golgi-Marker für die zellulären Subfraktionen herangezogen werden. Zudem ist er ein Markerprotein für den Lipid- und Proteintransport.

Exemplarisch für eine Präparation der Subfraktionierung wurde hier die Verteilung auf β -COP- untersucht. Diese Verteilung in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten ist in Abb. 42 dargestellt.

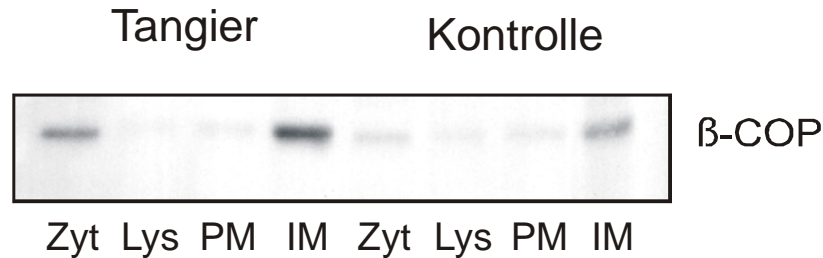


Abb.42: Western Blot-Analyse von β -COP in der Subfraktionierung zwischen Tangier und Kontrolle.

Jeweils 20 μ g Protein der in UZ getrennten intrazellulären Fraktionen wurden aufgetrennt. Es wurden nebeneinander die Fraktionen eines Tangier- und eines Kontrollprobanden aufgetragen.

Der Hauptanteil des β -COP-Proteins war sowohl im Tangier- als auch im Kontroll-Fibroblasten in der intrazellulären Membran-Fraktion (IM) lokalisiert. In allen anderen Membranfraktionen ließ sich nur eine geringe oder keine Detektion detektieren. Allerdings konnte man erkennen, dass in Tangierfibroblasten verglichen mit den Kontrollen β -COP höher exprimiert war. Bezogen auf die Gesamt-Proteinkonzentration hatte β -COP in Tangierfibroblasten eine um 98% erhöhte Expression. Dabei lag der Hauptanteil vom Gesamt-Protein bei Tangier in der IM-Fraktion vor. Weiter lies sich erkennen, dass ein Anteil im Zytosol lokalisiert war, der unter diesen Bedingungen und in diesem Ausmaß nicht in der Kontrolle zu detektieren war.

	Normal				Tangier			
Fraktion	Zyt	Lys	PM	IM	Zyt	Lys	PM	IM
β -COP (in OD)	513,1	79,44	99,3	1064,7	177,7	110,1	126,9	467,7
PM-Marker	0%	34%	52%	14%	0%	53,9%	56%	17%

Tab. 9: Quantitative Auswertung der Western Blot-Analyse.

Dargestellt sind die totalen OD-Werte der Image-Quant-Auswertung. In der zweiten Spalte ist die PM-Marker Verteilung in % der spezifischen Gesamtaktivität angegeben.

Die erhöhte Expression von β -COP in Tangierfibroblasten, vor allem in der IM-Fraktion, könnte im Einklang mit dem dilatierten Golgi in Tangier stehen. Die Verteilung zwischen den Membranen und dem Zytosol in Tangierfibroblasten war in Richtung des Zytosols

verschoben. Diese Befunde könnten auf eine gestörte Prozessierung des Proteins in Tangier hindeuten und im Zusammenhang stehen mit dem gestörten Cholesterin- und Proteintransport vom Golgi zur PM in Tangier.

1. Einfluss des zellulären Cholesterin-Gehalts auf die Adhärenz, Migration und Chemotaxis mononukleärer Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des zellulären Cholesteringehaltes auf die fMLP-induzierte Chemotaxis, die Adhärenz und das M-CSF-induzierte Zell-Spreading untersucht. Dabei war das prominenteste Ergebnis die Inhibition des M-CSF-induzierten Zell-Spreading und der fMLP-induzierten Chemotaxis von Monozyten durch Cholesterin-Entladung mit HDL₃ und apoA. In der Umkehrung wurden diese Prozesse durch die Cholesterin-Beladung mit E-LDL forciert. Auf der Regulationsebene konnte CDC42 als dasjenige Protein identifiziert werden, welches ursächlich an diesen funktionellen Prozessen beteiligt ist.

Im Weiteren wurde durch den mit HDL₃ und apo AI induzierten Cholesterinefflux eine signifikante Reduktion in der M-CSF-vermittelten Expression monozytärer Oberflächenmoleküle gemessen, die für die Adhäsion, Migration und das Scavenging relevant sind,

M-CSF spielt in der Atherogenese eine zentrale Rolle, indem es unter anderem das Rekrutieren von Monozyten zur Arterienwand und eine nachfolgende Transmigration mit anschließender Schaumzellformation induziert und vorantreibt. Wie hier gezeigt werden konnte, limitiert HDL₃ und apo AI genau diese Prozesse, die für die transendotheliale Migration erforderlich sind. Die Migration beinhaltet eine Sequenz von Ereignissen, die mit der endothelialen Adhäsion beginnen. Nachfolgend bilden die Monozyten Zellausläufer aus, die für das Spreading mit einhergehender Polarisierung, Elongation und motiler Aktivität der Zellen charakteristisch sind. Weiter dienen diese Filopodien als Sensoren für die Chemotaxis, da an deren Oberfläche die fMLP-Rezeptoren und andere Chemokin-Rezeptoren lokalisiert sind. Die Stimulation frisch elutrierter Monozyten mit HDL₃ und apo AI inhibiert deutlich die Chemotaxis entlang des fMLP-Gradienten.

Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Beweis für die anti-atherogene Rolle des HDL₃ und seines Apolipoproteins (apo AI) im Prozess der Atherogenese.

Auch die Expression einer Reihe arteriosklerotisch wichtiger Gene in Monozyten ist von M-CSF abhängig. Während der M-CSF-induzierten Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen wird die höchste Induktion bei Genen beobachtet, die mit dem Lipid-Metabolismus, z.B. Apo E, Apo CI, die 27-Hydroxylase und der sauren lysosomalen Lipase assoziiert sind [Hashimoto et al. (1999)].

M-CSF steigert die Proliferation und Differenzierung der Monozyten und ist essentiell für das Überleben und die Aktivierung der Monozyten und Makrophagen in der

Gefäßwand. LPS, IL-1 α und TNF α induzieren die M-CSF-Akkumulation und M-CSF-Sekretion in Endothelzellen und glatten Muskelzellen, wobei die lokale Produktion von M-CSF für die Proliferation der Makrophagen entscheidend ist. Die Expression von M-CSF-Subklassen auf der Oberfläche von Endothelzellen und glatten Muskelzellen fördert die Monozyten-Migration. Humane arteriosklerotische Läsionen weisen eine hohe M-CSF-Protein-Konzentrationen in der Assoziation mit Makrophagen auf. Rekombinantes M-CSF führt zur Akkumulation der mRNA für den Scavenger Rezeptor Typl und für ApoE [Clinton et al. (1992)]. Dieses Zytokin steigert somit die Aufnahme von modifiziertem LDL und die nachfolgende Cholesterin-Veresterung, so dass die Transformation in Schaumzellen vorangetrieben wird.

Über den M-CSF-Rezeptor aktiviert M-CSF Ras-abhängige und Ras-unabhängige Signaltransduktionskaskaden [Hamilton (1997)]. Die Stimulation von Ras führt über den Raf/MAPK-Kinase-Pathway [Jaworowski et al. (1999)] zum Zellwachstum, wohingegen Ras-unabhängig die PLA2 und PKC in humanen Monozyten aktiviert werden. MCSF stimuliert die Translokation der PKC zur Membranfraktion und steigert die Hydrolyse von PC zu DAG, welches als „second messenger“ bekannt ist. [Imamura et al. (1990)].

Weitere Beweise für die Rolle von M-CSF in der Atherogenese lieferten Studien an op/op-Mäusen, die eine strukturelle Mutation im M-CSF-Gen aufwiesen. Die Atherogenese in diesem Modell ist entweder mit einer Cholesterin-Diät oder mit der Kreuzung der op/op-Mäuse mit Mäusen, die eine Defizienz im Apo E aufwiesen, induziert worden. In beiden Maus-Modellen wurde eine signifikante Reduktion in der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen beobachtet. Da die op/op-Mäuse hohe Konzentrationen von atherogenen Lipoproteinen aufweisen, scheint hier die regressive Entstehung der Arteriosklerose auf die Verminderung zirkulierender Monozyten, reduzierter Gewebs-Makrophagen und, vor allem auf die verminderten M-CSF-Konzentration in den Arterien zurückzuführen sein [Qiao et al. (1997); de Villiers et al. (1998)].

In einer BAC1.25F-Zelllinie wurde der Einfluß von M-CSF, der als potenter Chemoattraktant bekannt ist, auf die Chemotaxis entlang eines M-CSF-Gradienten untersucht. Die Stimulation von hungrigen Zellen mit M-CSF führt schnell zur Ausbildung von Filopodien und zur Zellpolarisation. Diese Zellen zeigen eine schnelle Migration, aber keine Orientierung entlang des Gradienten. Werden Zellen, die zuvor dem Chemokine entzogen wurden, wieder mit M-CSF stimuliert, zeigen sie später in der Chemotaxis eine Orientierung entlang des Gradienten. Das bedeutet, dass M-CSF als

chemokinetisches und chemotaktisches Agenz auf die Zellen einwirken kann [Webb et al. (1996)].

Wenn nun, wie gezeigt, HDL₃ und apo AI die Prozesse, die für die transendotheliale Migration erforderlich sind inhibiert, und die Chemotaxis entlang eines fMLP-Gradienten deutlich vermindert, könnte das bedeuten, dass der Effekt von HDL₃ und apo AI nicht Agonisten-spezifisch ist, sondern in der Regulation eines generellen Prozesses der Migration begründet liegt.

Diese These kann mit weiteren Daten, die die Rolle von HDL und LDL in der MCP-1 induzierten Migration monozytärer Zelllinien beschreiben, bestätigt werden. So ist HDL in der Lage die MCP-1-vermittelte Migration von THP1-Zellen zu inhibieren [Han et al (1998)]. In Mäusen, die eine Defizienz im CCR2-Gen aufweisen, konnte trotz fettreicher Diät eine Reduktion in der Entstehung der Arteriosklerose beobachtet werden. Auch bei der MCP-1-Defizienz in LDL-Rezeptor $-/-$ Mäusen konnte eine Reduktion in der Rekrutierung von Monozyten zur Gefäßwand gezeigt werden. Umgekehrt wird die CCR2-Expression durch LDL gesteigert und damit auch die Akkumulation von Monozyten in der Arterienwand. So kann HDL die LDL-induzierte Expression von CCR2 nachhaltig reduzieren.

Diese Ergebnisse korrelieren stark mit den beschriebenen Ergebnissen, nach denen enzymatisch modifiziertes LDL (E-LDL) den inversen Effekt auf das Zellspreeding und die Chemotaxis von Monozyten zeigt.

Aber nicht nur die Prozesse, die vorwiegend für die Transmigration und Chemotaxis erforderlich sind, werden beeinflusst. Ebenfalls wird die Adhärenz der Monozyten durch den Lipidstatus moduliert. Alle in der vorliegenden Arbeit vermessenen Integrine, wie die β 2-Integrine CD11a, b, c und das β 1-Integrin CD49d, wurden in ihrer Expression während der M-CSF-induzierten Monozyten-Differenzierung hochreguliert. Durch die Stimulation mit HDL₃, apo AI oder E-LDL wurde eine inverse Regulation der Integrin-Expression kultivierter Monozyten beobachtet. Die β 2-Integrine CD11a, b, c und das β 1-Integrin CD49d wurden durch den Cholesterin-Efflux signifikant supprimiert und durch die Cholesterin-Beladung hochreguliert. Ebenfalls werden der FC γ RIII-Rezeptor/CD16 und der Scavenger-Rezeptor CD163 durch HDL₃ und apo AI im Vergleich zu E-LDL invers reguliert. Der inhibitorische Effekt von HDL₃ und apo AI auf die Expression von CD16 wird bestätigt durch die Beobachtung, dass die CD16 positiven Monozyten-Subpopulationen negativ mit dem Plasma-HDL korrelieren [Rothe et al. (1996)]. Der FC γ RIII-Rezeptor/CD16 ist involviert in die Aufnahme von Immun-komplexierten Lipoproteinen und somit beteiligt in der Schaumzell-Transformation. Die verminderte

Expression dieses Immunglobulin-Rezeptors nach HDL₃ und apo AI-Stimulation wirkt also präventiv auf die Monozyten-Transformation ein [Morganelli et al. (1995)]. Der Scavenger-Rezeptor CD163 ist involviert in inflammatorische Prozesse [Büchler et al. (2000)] und in die Adhäsion von Monozyten an das aktivierte Endothel [Hogger et al. (1998)]. CD16 und CD163 werden zudem durch die erwähnten Lipoproteine stärker reguliert als die Integrine, da sie in die Aufnahme modifizierter Lipoproteine involviert sind.

Wie in Kapitel 1.1.2 und 1.1.4.2. ausführlich beschrieben, wird die VCAM-1 und ICAM-1-Expression auf Endothelzellen ebenfalls durch HDL und LDL invers reguliert, was mit den Daten für die Integrin-Expression als Counter-Part für diese Adhäsionsproteine auf Monozyten gut korreliert [Baker et al. (1997), Calabresi et al. (1999), Cockerill et al. (1995)].

In einer Studie mit THP-1-Zellen, die auf mit IL-1 aktivierten Endothelzellen kultiviert wurden, konnten während der Migration folgende Beobachtungen gemacht werden. Während der Transmigration von Monozyten durch die endotheliale Passage bilden die Monozyten LFA-1 umsäumte Pseudopodien aus, während das Spreading unterhalb des Endothels entwickelt wird. Während der Transmigrationspassage lassen sich hohe Konzentrationen von F-Actin und α -Catenin an der Schnittstelle der Endothelzellen und Monozyten detektieren, was auf E-Cadherin-vermittelte Zell-Interaktionen hinweist. LFA-1 (CD11b/CD18) ist in Clustern an der Zelloberfläche der Monozyten lokalisiert, wobei PECAM-1 an endothelialen Kontakt-Regionen des transmigrierenden Monozyten akkumuliert. Dieses Adhäsionsmolekül wird nur während der Transmigration auf Monozyten exprimiert, wird aber nicht mehr auf gespreadeten Zellen detektiert, während die Integrine in allen Phasen der Extravasation exprimiert werden. Die Akkumulation von LFA-1 auf Monozyten während des Transmigrations-Prozesses weist auf seine Interaktion mit ICAM-1 und ICAM-2 auf den Endothelzellen hin. F-Actin kann in der Koloalisation mit LFA-1 an den Pseudopodien der Monozyten detektiert werden. Als Linker-Moleküle des Aktinzytoskeletts zwischen den Endothelzellen und den Monozyten kommen die Catenine in Frage, die ebenfalls in hoher Konzentration während dieser Migration detektiert werden. Hier wird deutlich, dass eine festgelegte zeitliche und räumliche Reihenfolge und Dynamik in der Verteilung der Expression der verschiedenen Integrine, Adhäsionsmoleküle und Chemokin-Rezeptoren während der Adhäsionskaskade und der Transmigration von Bedeutung sind [Sandig et al. (1997); Sandig et al. (1999)].

Der inhibitorische Effekt von HDL₃, apo AI auf das Monozyten-Spreading, die Chemotaxis und die Integrin-Expression hängt mit der Regulation des zellulären Cholesterin-Pools zusammen. HDL₃ ist bekannt für seine Funktion, den zellulären Cholesterin-Efflux und den reversen Cholesterin-Transport zur Leber zu steigern. Die Hypothese, dass die Regulation des Cholesterin-Pools auf die oben beschriebenen Prozesse Einfluß nimmt, wird bestätigt durch die fehlende Reduktion im Spreading nach apo AI-Stimulation in TD-Monozyten, die sich durch das Fehlen des apo AI-induzierten Cholesterin-Efflux auszeichnen. Als Regulationsprotein des HDL-Stoffwechsels wurde ABCA1 identifiziert. Bei Tangier-Patienten liegt eine Mutation des ABCA1-Gens vor. Weiter wurde gezeigt, dass Cyclodextrin, welches spezifisch den Cholesterin-Anteil aus biologischen Membranen depletiert, im Vergleich zu apo AI denselben Effekt auf das monozytäre Spreading und die Chemotaxis in Monozyten von normalen Spendern ausübt. Das bedeutet, dass die Depletion zellulärer Cholesterin-Pools kausal mit der Inhibition des Spreading, der Adhärenz und der Chemotaxis zusammenhängt.

Diese Ergebnisse sprechen für eine kausale Beteiligung des ABCA1 vermittelten Cholesterinefflux an den durch apoA-I und HDL₃ bewirkten Effekten. Erstaunlich war, dass die hemmenden Wirkungen von apoA-I, HDL₃ und p-Cyclodextrin auf das Zellspreading, trotz unterschiedlich starker Stimulation des Cholesterinefflux, annähernd gleich waren. Dies ließ vermuten, dass die Depletion spezifischer zellulärer Cholesterinkompartimente an der Vermittlung der Effekte beteiligt war. Diese Hypothese wurde in weiteren experimentellen Ansätzen am hiesigen Institut untersucht.

Im Jahr 2000 wurde in einer zentralen Arbeit von Röper et al. gezeigt, dass spezielle cholesterinbasierte Plasmamembrandomänen, sogenannte Lubrol-Rafts, als Bausteine von Membranprotrusionen fungieren. Es war nahe liegend, dass der apoA-I bzw. HDL₃ vermittelte Cholesterinefflux aus diesen Strukturen erfolgt. Lipidmikrodomänen, sog. Rafts, stellen laterale Organisationsstrukturen biologischer Membranen dar, die angereichert sind in Cholesterin, Sphingolipiden und gesättigten Phospholipiden. Durch Isolation bestimmter Lipidmikrodomänen und Zuordnung bestimmter Elemente zu spezifischen Rafts wurde durch eine am Institut entwickelte massenspektroskopische Methode die Lipidkomposition dieser Lubrol-Rafts charakterisiert [(Drobnik et al (2001))]. Festgestellt wurde, dass es sich um cholesterinbasierte Strukturen handelt, die sich von klassischen Triton-Rafts durch einen höheren Anteil an ungesättigten Phospholipiden und eine niedrigere Ratio von Cholesterin zu cholinhaltigen Phospholipiden unterscheiden. In Monozyten fand sich ein Teil des zellulären ABCA1 und CDC42 in den Lubrol-Rafts, nicht aber in der Triton-Fraktion. Somit erfüllten beide Proteine die

Definition von Lubrol-Raft Konstituenten. Die Assoziation von CDC42 mit Lubrol-Rafts deckte sich mit der Rolle von Lubrol-Rafts als Bausteine von Membranprotrusionen. Die Assoziation von ABCA1 mit diesen Strukturen wurde als Hinweis auf eine Assoziation des apoA-I vermittelten Lipidefflux mit diesen Lipiddomänen gewertet. Tatsächlich ergaben weitere Untersuchungen, dass der apoA-I vermittelte Lipidefflux in Monozyten exklusiv aus Lubrol-Rafts erfolgte und somit eine mögliche Erklärung für den hemmenden Effekt von apoA-I auf die Bildung von Membranprotrusionen gegeben war. HDL₃ führte zusätzlich zur Lipiddepletion von Lubrol-Rafts auch zu einem Lipidefflux aus klassischen Triton-Rafts.

Die beschriebenen Untersuchungen liefern mögliche Erklärungsansätze für die hemmende Funktion von apoA-I und HDL₃ auf die Bildung von Membranprotrusionen und die Migration von Monozyten. Wie anfänglich postuliert, nimmt der Cholesterin-Efflux Einfluss auf die Zellregulation der Migration. Dieser Zusammenhang könnte zumindest für einen Teil der, in der Einleitung unter Punkt 1.1.4. beschriebenen zellulären HDL-Effekten, von Bedeutung sein.

Umgekehrt werden die zellulären Ereignisse wie das Spreading und die Chemotaxis durch die Beladung der Zellen mit Cholesterin forciert. Im Gegensatz zu ac-LDL oder oxLDL kann das für die Stimulation verwendete E-LDL die Monozyten in der frühen Phase ihrer Differenzierung effektiv mit Cholesterin beladen. Diese Beladung ist begleitet mit der Hochregulation der Expression von zwei Klasse B Scavenger Rezeptoren CLA-1/SR-BI und CD36 [Kapinsky et al. (2001) und eigene Daten]. Kompetitive Studien in dieser Publikation zeigten, dass E-LDL von CD36 in die Zellen aufgenommen wird. Der SR-BI-Rezeptor wurde durch E-LDL hochreguliert, so dass dieser an der vermehrten Aufnahme von Lipiden beteiligt sein könnte. Zudem ist bekannt, dass SR-BI HDL bindet und die Aufnahme von HDL-Lipiden und den Cholesterin-Efflux vermittelt [Calvo et al (1997)].

2. Die Rolle von CDC42 in der Migration monozytärer Zellen

Wie eingehend beschrieben (Kap. 1.2.3.), wird die Ausbildung von Filopodien sowohl in Fibroblasten als auch in Monozyten durch CDC42 reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Zusammenhang zwischen dem Zellspreading und der Regulation durch CDC42 durch AS-Experimente untersucht. Es wurde ein eindeutiger Effekt der CDC42-AS auf das M-CSF-induzierte Spreading elutrierter Monozyten gezeigt,

wohingegen das Kontroll-Oligonukleotid keinen Effekt zeigte. Das CDC42-AS-Oligonukleotid vermochte das Spreading signifikant zu inhibieren.

In der Literatur wird beschrieben, dass negative Mutanten von CDC42, die Filopodien-Ausbildung monozytärer Zellen inhibieren, und umgekehrt, aktive Mutanten das Spreading fördern [Allen et al. (1998); Price et al. (1998)].

Die Zellmigration beginnt mit der Extension der PM am Migrationspol der Zelle. Diese morphologische Änderung wird begleitet von der Polarisierung der Zelle, so dass zwei Pole ausgebildet werden. An der Vorderseite der Zelle wird die „Leading edge“ gebildet, wo die Chemokin-Rezeptoren und die Integrine clustern, und intrazellulär über G-Proteine die Signaltransduktions-Kaskade in Gang gesetzt wird [Sanchez-Madrid and del Pozo (1999)]. An der Hinterseite der Zelle, dem „Uropod“ sind andere Adhäsions-Moleküle geclustert, nämlich die ICAMs, CD44, Mac-1 und FC γ RIII-Rezeptoren. Dieser Teil der Zelle ist verantwortlich für Zell-Zell-Kontakte und vermittelt das Rekrutieren und die transendotheliale Transmigration. Ein Protein-Komplex aus Tyrosin-Kinasen, Lipid-Kinasen, Second-Messengers und den Rho-Proteinen reguliert die Zytoskelett-Arrangements während der Polarisierung und der Migration [Sanchez-Madrid und del Pozo (1999)]. Die gerichtete Migration wird durch die Polymerisation von Actin-Filamenten angetrieben und durch die Formation von adhäsiven Komplexen (Integrine) stabilisiert. Die Adhäsions-Komplexe sind die Orte der Zytoskelett-Struktur, an denen sich der Zellkörper entlang zieht. Dabei kommt es am Ende des Zellkörpers zum Verdrängen der „Fokal-Komplexe“. Weitere Komponenten, die die Spannung und die Beweglichkeit des Zellkörpers vermitteln, sind das Aktin-Myosin-Netzwerk und die Mikrotubuli [Horwitz and Parson (1999); Lauffenberger and Horwitz (1996)]. Die Vermittler dieser Spannung sind die Transmembran-Rezeptoren der Integrine, die Komponenten der extrazellulären Matrix mit dem zytoplasmatischen Aktin-Zytoskelett verbinden. [Horwitz and Parson (1999)]. Die Produktion, Formation und Stabilität dieser Zytoskelett-Komplexe an der Zellperipherie wird durch Rac und CDC42 reguliert. CDC42 reguliert die Polymerisation und Organisation von Aktin am Migrationspol der Zelle, um Filopodien zu formen. Die kontraktile Kraft am Migrationspol wird durch die Phosphorylierung der MLC moduliert. Die PAK, welche durch GTP-gebundenenes CDC42 aktiviert wird, kontrolliert die MLC-Phosphorylierung über die Modulation der Myosin-Light-Chain-Kinase, wonach es zur Dimerisierung der Ketten und Interaktion mit Aktin kommt. Im Gegensatz dazu aktiviert Rho die Rho-Kinase, welche die Myosin-Phosphatase inhibiert, während die MLCs im phosphorylierten und somit im kontraktilen Zustand verbleiben. Diese kontraktile Kraft organisiert Actin-Filamente in den Integrin-

Clustern, welche große Adhäsions-Komplexe formieren, wobei die Zelle sich abrundet [Horwitz and Parson (1999)]. Die Myosine könnten dabei mit den ERM-Proteinen über die Myosin-Bindungs-Untereinheit der Myosin-Phosphatase einen Komplex formen, der die Aktin-Filamente mit der PM verbindet [Sanchez-Madrid and del Pozo (1999)].

Das Arbeitsmodell geht davon aus, dass die Rho-Proteine am Migrationspol aktiv sind, um die Aktin-Polymerisation zu regulieren und am „Uropod“ inaktiviert zu werden [Sanchez-Madrid and del Pozo (1999)]. Somit sind die Rho-Proteine die Regulatoren der Polarisierung. Für CDC42 ist bekannt, dass es die Polarisierung von T-Zellen über die Regulation von Actin und Mikrotubuli induziert, nachdem diese in Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen kommen [Stowers et al. (1995)].

Wie in der Einleitung besprochen, werden während der Transmigrationsprozessen hohe Konzentrationen von Cateninen detektiert, so dass angenommen wird, dass die E-Cadherin-vermittelte Zell-Interaktion in diesen Prozeß involviert ist. Die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion aktiviert CDC42. Die Rolle von CDC42 konnte durch einen Aktivitätsassay mit dem GST-Fusionsprotein für die GTPase-Bindungs-Domäne von WASP aufgeklärt werden. Die Initiierung von E-Cadherin-vermittelten Zellkontakten zwischen Epithelzellen vermehrt Zeit-abhängig die Konzentration von aktivem CDC42 und es kommt zur Translokation von CDC42 an die PM [Stella et al. (2000)]. Allerdings konnte kein Beweis dafür erbracht werden, dass CDC42 direkt mit E-Cadherin interagiert. Ein potentieller Kandidat, der diese Interaktion vermittelt ist IQGAP, welches direkt CDC42 und E-Cadherin bindet. IQGAP konkurriert mit α -Catenin um die Bindung zu E-Cadherin- β -Catenin, was zur Auflösung des Zell-Zell-Kontaktes führt [Kaibuchi et al. (1999)]. Durch die Beobachtung, dass aktives CDC42 den Effekt von IQGAP inhibieren kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass CDC42 und IQGAP als positive und negative Regulatoren der E-Cadherin-Aktivität fungieren können. Klar ist, dass eine bidirektionale Beziehung zwischen CDC42 und der E-Cadherin vermittelten Signaltransduktion besteht [Kuroda et al. (1998); Kuroda et al. (1999)].

Wie im nächsten Kapitel beschrieben, wird die CDC42-Expression auf die gleiche Weise wie das Zellspreeding durch den Cholesterinstoffwechsel reguliert. Dies liefert nicht nur den Beweis, dass CDC42 als Regulator des Monozyten-Spreeding fungiert, sondern ergibt eine neue Interpretationsebene zwischen Cholesterinstoffwechsel und Zellregulation.

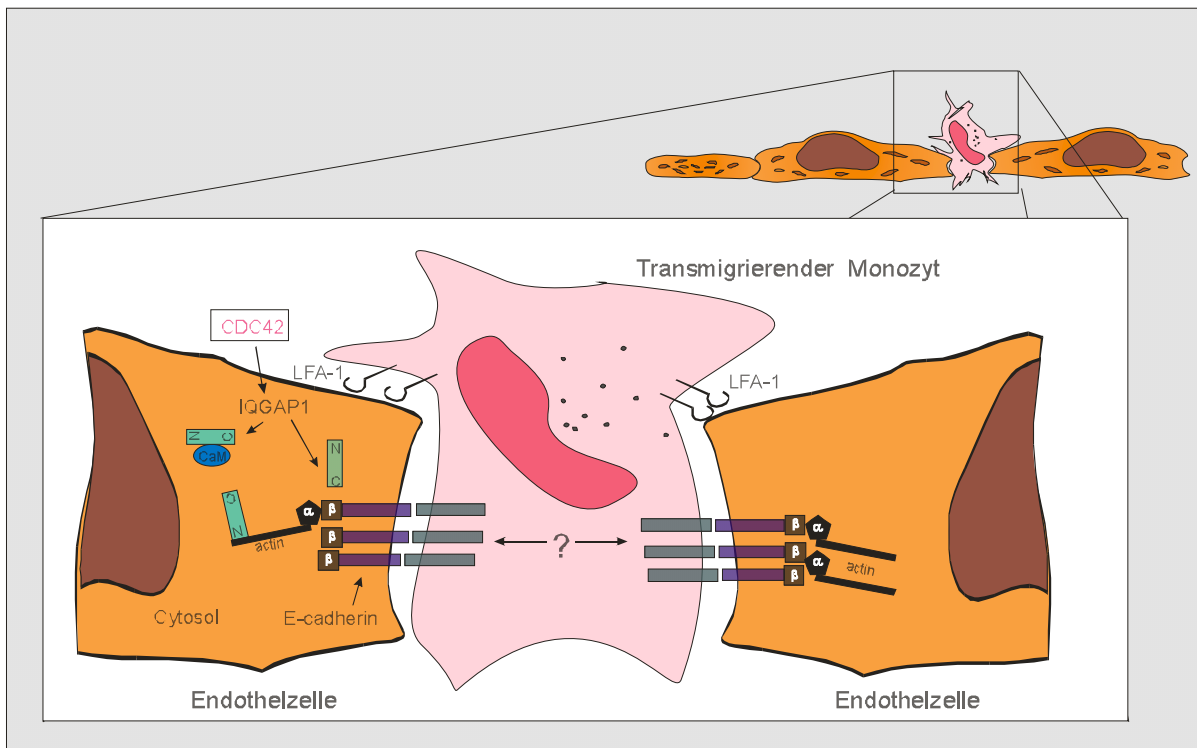


Abb.43: Transmigration eines Monozyts: Modell der Interaktionen zw. CDC42, IQGAP, E-Cadherin und Adhäsionsmolekülen

2.1. Modulation der CDC42-Expression durch Lipoproteine

In Übereinstimmung mit dem durch M-CSF induzierten Spreading konnte durch M-CSF eine ansteigende CDC42-Expression in Monozyten während der Kultivierungsdauer detektiert werden. Sowohl eine 24h-Stimulation als auch eine kontinuierliche Stimulation mit HDL₃ oder apo AI konnte die CDC42-Protein-Expression signifikant supprimieren. In umgekehrter Weise wurde die Expression durch enzymatisch modifizierte LDL, sog. E-LDL hoch reguliert. Die Ergebnisse auf Western-Blot-Ebene konnten durch Flow-Zytometrische Untersuchungen der intrazellulären CDC42-Expression bestätigt werden. Allerdings konnte auf RNA-Ebene weder eine Modulation des CDC42-Transkripts durch die Agonisten noch eine deutliche Induktion durch M-CSF gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Aepfelbacher et al. überein. Seine Arbeitsgruppe konnte eine ansteigende CDC42-Expression während der Monozyten-Differenzierung mit dem Spreading und der Anzahl CD11b positiver Monozyten korrelieren [Aepfelbacher et al. (1994)]. Ebenfalls wurde nur eine Steigerung der Translation während der Monozyten-Differenzierung beobachtet. Die fehlende Modulation des Transkripts durch die Stimulation könnte auf eine hohe Stabilität der CDC42-RNA hinweisen. Es könnte auch sein, dass durch posttranslationale

Modifikationen das Protein entweder eine erhöhte oder eine erniedrigte Stabilität erfährt.

Als weiteres Ergebnis wurde durch einen Aktivitäts-Assay mit der CRIB-Domäne von PAK1b, die spezifisch an GTP-CDC42 bindet, eine Supprimierung der biologisch aktiven Form von CDC42 durch apo AI detektiert. Zusammengenommen mit den Ergebnissen der Modulation des Spreading und der Chemotaxis konnte hier ein potentieller „Down-Stream“-Regulator identifiziert werden, der Veränderungen im zellulären Cholesterin-Gehalt mit der Signaltransduktion des Zytoskelettes verbindet. Die Hypothese, dass CDC42 Cholesterin-sensitive Prozesse reguliert, wird durch den Befund unterstrichen, dass auch Cyclodextrin die CDC42-Expression inhibiert.

Eine Verbindung zwischen der CDC42-Signaltransduktion und dem Cholesterin-Gehalt konnte ebenfalls in einer Publikation, die die Regulation von CDC42 mit der CD47-vermittelten Motilität korrelieren, gezeigt werden. CD 47 ist ein Integrin bindendes Protein. Die Formation des CD47-assoziierten Signaltransduktions-Komplexes wird durch Cholesterin reguliert [Yoshida et al. (2000); Green et al. (1999)].

HDL₃ reduziert den zellulären Cholesterin-Gehalt und die CDC42-Expression, so dass eine kausale Beziehung zwischen Cholesterin und der CDC42-Biosynthese hergestellt werden kann.

Ein weiteres Indiz für die Regulation der CDC42-Expression durch Cholesterin konnte nach einer Gen-Daten-Recherche erbracht werden. Die Promotor-Region des CDC42-Gens enthält drei hypothetische SRE-Elemente, die eine hohe Homologie zum SRE-Element des LDL-Rezeptors ausweisen.

Zusammengefasst zeigt die Beziehung zwischen dem Cholesterin-Metabolismus und der CDC42-Biosynthese ein Indiz für die Relevanz von CDC42 in der Arteriosklerose.

5.3. CDC42 und humane Erkrankungen

Bekannt ist, dass Mitglieder aus der Ras-Superfamilie als Onkogene wirken, wenn sie dauerhaft entweder in aktivierter oder aber in inaktivierter Form vorliegen, was zur Transformation von Zellen führt. Dieses Phänomen ist in Zelllinien beschrieben, wobei oft die Guanin-Nukleotid-Exchange-Faktoren durch eingeführte Mutationen daran beteiligt sind, die GTPasen in ihrer aktiven oder inaktiven Form zu halten. Durch diese Mutationen werden Störungen in den zahlreichen Signaltransduktionskaskaden hervorgerufen und es kommt zur Zellentartung und Tumorprogression. In diesem Zusammenhang ist die Beteiligung der Rho-Proteine in der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion und Invasion von Epithelzellen zu nennen, welche den invasiven Phänotyp

von epithelialen Tumoren determiniert [Banyard et al. (2000); Michiels and Collard (1999); Sander and Collard (1999)]. Transformation von humanen Epithelzellen in invasive Karzinom-Zellen setzt eine Änderung in der Integrin-vermittelten Adhäsion an die extrazelluläre Matrix voraus. Dies beinhaltet den Verlust der normalen Polarisierung und Differenzierung und eine Veränderung des Zytoskeletts.

In diesem Kontext konnte von Eisenmann et al. [Eisenmann et al. (1999)] eine Beteiligung von CDC42 im Melanoma-Chondroitin-Sulphat-Proteoglycan (MCSP)-vermittelten Spreading gezeigt werden. MCSP ist ein Oberflächen-Antigen, welches im Wachstum und der Invasion von Melanom-Tumoren beteiligt ist. Dieses Protein wird früh in der Progression des Melanoms exprimiert und stimuliert die Integrin- $\alpha_4\beta_1$ -vermittelte Adhäsion und das Spreading von Melanom-Zellen. Stimuliertes MCSP rekrutiert Tyrosin-phosphoryliertes p130^{cas}, ein Adapter-Protein der Tumor-Migration, die CDC42-assoziierte Tyrosin-Kinase ACK-1 und aktiviertes CDC42, um das Spreading zu vermitteln. Das bedeutet, dass MCSP die Zellinvasion über eine Signaltransduktionskaskade vermittelt, in der die CDC42-Aktivierung mit nachfolgender Aktin-Reorganisation involviert ist.

Ein weiteres Effektor-Protein von CDC42 konnte identifiziert werden, nachdem die Mutation im Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) gefunden wurde. Das Wiskott-Aldrich Syndrom ist eine rezessiv-geschlechtsgebundene Erbkrankheit mit Thrombopenie, Infektanfälligkeit und Ekzemenneigung. Es werden nur Knaben betroffen. Patienten sterben meist schon früh an Infektionen [Symons et al. (1996)]. Die WAS-Patienten weisen einen zytoskelettalen Defekt in hämatopoetischen Zellen auf. WASP interagiert direkt mit CDC42, schwach mit Rac und nicht mit Rho. Diese Interaktion führt zur Aktin-Polymerisierung und Filopodien-Induktion [Miki et al. (1998)]. Monozyten von diesen Patienten zeigen eine Inhibition der Chemotaxis gegenüber einem MCP-1 oder fMLP-Gradienten, die Induktion der CD11b/CD18-Expression ist normal. Allerdings ist die Filopodien-Ausbildung dieser Monozyten inhibiert, sie zeigen eine abgerundete Zellgestalt. Weiterhin zeigen die Monozyten eine verschlechterte Adhärenz an Oberflächen [Zicha et al. (1998); Badolato et al. (1998)]. Aber nicht nur die Monozyten zeigen eine Zytoskelettanomalie, auch die T-Lymphozyten und Plättchen. Die dendritischen Zellen (DC) weisen ebenfalls eine zytoskelettale Abnormalie auf, sie zeigen eine gestörte Polarisierung und eine verminderte Migration. Zugrunde liegt diesen Defekten eine strukturelle Anomalie in der WASP-CDC42-vermittelten Filopodien-Ausbildung. Zudem ist die Interaktion zwischen den Integrinen und dem Zytoskelett dysfunktional. Die WAS-DC sind somit nicht in der Lage, die normalen

Funktionen der Antigen-Präsentation und Erkennung zu erfüllen. Die Makrophagen und andere Antigen-präsentierende Zellen sind in ihrer Beweglichkeit und Migration eingeschränkt [Binks et al. (1998)]. Die Signaltransduktionskaskade zwischen PM-Rezeptoren, der Aktivierung von CDC42, der Phosphorylierung von WASP und der Rekrutierung weiterer Adapter- und Linker-Proteine, die die Bindung zum Aktin-Filament vermitteln, ist in hämatopoetischen Zellen von WAS-Patienten gestört [Mullins (2000) and Guinamard (1998)].

Störungen in der CDC42-vermittelten Signaltransduktion können somit zu pathologischen Auswirkungen in der Zelle führen und ein Krankheitsbild beschreiben.

5.3.1. CDC42 und Tangier-Erkrankung

Die bekannten Funktionen von CDC42 in der Regulation des Zytoskeletts, der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion, des vesikulären Transports und des Zellwachstums korrelieren auffallend mit den zellulären und funktionalen Störungen in der Tangier-Erkrankung. Tangierfibroblasten zeigen in Zellkultur die folgenden Abnormalitäten:

- ein reduziertes Wachstum und einen G2/M-Phasen Arrest,
- gestörte Lipoprotein-induzierte Signaltransduktion, gestörte Aktivierung der PI-PLD und PLC,
- gestörter vesikulärer Transport, reduzierter HDL-vermittelter Cholesterin-Efflux, gestörter Spingolipid-Transport,
- Dilatation des trans-medial Golgi,
- Zytoskelett Anomalie, vergrößerte Zelloberfläche,
- erhöhter Ceramid- und cAMP-Spiegel.

All diese zellulären Störungen lassen sich mit der zellulären Signaltransduktion von CDC42 in Beziehung setzen. CDC42 fungiert somit hypothetisch als Signaltransduktor für eine Vielzahl in Tangier gestörter Zellprozesse.

Wenn man CDC42 im Modell als zentrale Schaltstelle darstellt, so würde folgende Darstellung die Beziehung zwischen der Tangier-Erkrankung und den Funktionen von CDC42 wieder geben.

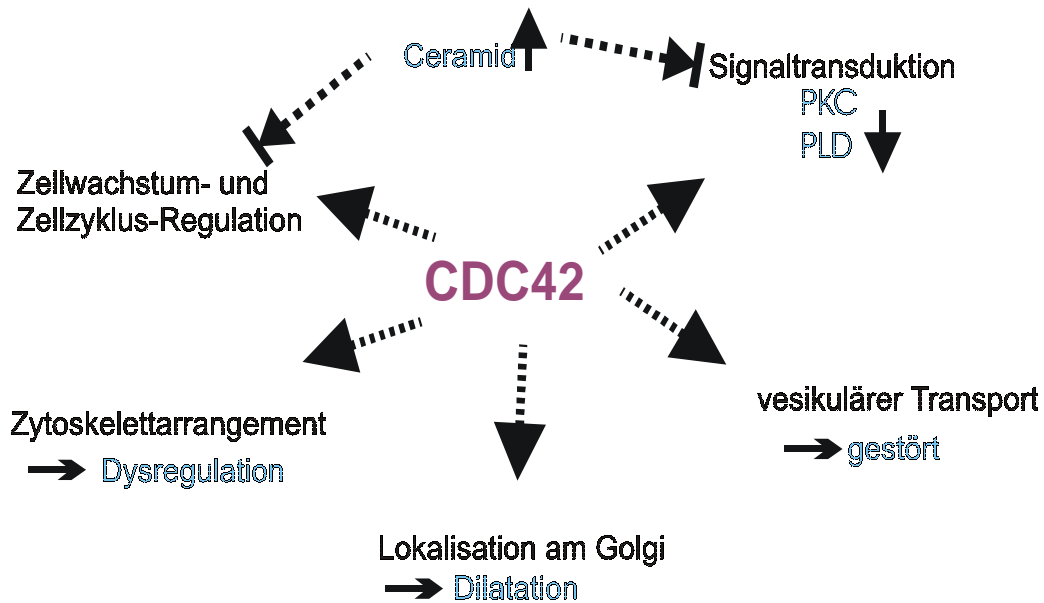


Abb. 44: Potentielle Beziehung zwischen den Funktionen von CDC42 und den zellulären Störungen in der Tangier-Erkrankung

Es konnte von Walter et al. [Walter et al. (1996)] durch Untersuchungen an Fibroblasten gezeigt werden, dass die normale Signaltransduktionskaskade [Moellers et al. (1995)] nach Einwirkung von HDL₃ auf Tangier-Zellen gestört ist. Sowohl die PI-PLC als auch die PC-PLD wird durch HDL₃ in Tangier-Fibroblasten geringer als in Kontroll-Zellen induziert. Bei Untersuchungen mit einem DAG-Analogon, welches potent die PKC aktiviert, konnte gezeigt werden, dass diese Stimulation eine deutliche Steigerung des Cholesterin-Effluxes zur Folge hat. Dies führte zu der Arbeitshypothese, dass die defekte PI-PLC-vermittelte Signaltransduktion mit verringerter PKC-Aktivierung in Tangier eine zentrale Rolle für die Reduktion im Lipid-Efflux darstellt [Rogler et al. (1995)]. Zusätzlich ist in Tangier-Fibroblasten die PC-PLD deutlich geringer induziert. Die pharmakologische Substanz Propanolol konnte ebenfalls den HDL₃-vermittelten Efflux von Cholesterin normalisieren. Propanolol steigert die intrazelluläre PA-Konzentration. PA besitzt im Zusammenspiel mit PIP₂ eine wichtige Rolle bei der Vesikelbildung am Golgi. Ebenfalls scheint DAG für eine ungestörte Vesikelbildung essentiell zu sein. Diese Befunde weisen auf eine in Tangier gestörte Vesikelbildung am Golgi hin, die mit dem reduzierten intrazellulären Transport von Cholesterin in direktem Zusammenhang steht. Wie beschrieben, besitzt CDC42 mit ARF eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der PLD und der nachfolgenden Vesikelbildung. Hier wird die erste funktionelle Beziehung zwischen CDC42, der defekten Signaltransduktion und dem gestörten vesikulären Transport in Tangier deutlich.

Bekannt ist weiterhin, dass CDC42 eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Die Injektion der aktiven Form von CDC42 in 3T3-Fibroblasten stimuliert die Zellzyklus-Progression in der G1-Phase und die nachfolgende DNA-Synthese. Die dominant negative Form des Proteins blockiert hingegen die Serum-induzierte DNA-Synthese [Olson et al. (1995)]. Der Eintritt in die S-Phase von ruhenden, kultivierten Zellen ist abhängig von der Phosphorylierung des Retinoblastoma-(Rb)-Gen Produkts pRb, welches anschließend den Transkriptionsfaktor E2F aktiviert. Weiterhin ist die Aktivierung vom Cyclin-abhängigen Kinase-Pathway abhängig. Die Cyclin D-Expression wiederum wird durch CDC42 reguliert. Es wird kontrovers diskutiert, ob CDC42 transkriptionell oder posttranskriptionell die Cyclin D-Expression reguliert [Marshall (1999); Guo and Hay (1999)].

In Tangier-Fibroblasten kann neben der veränderten Morphologie ein vermindertes Wachstum nachgewiesen werden. Die reduzierte Proliferation ist bedingt durch eine verminderte Ansprechbarkeit auf mitogene Stimuli und ist nicht auf bestimmte Wachstumsfaktoren beschränkt [Drobnik et al. (1999)]. Die erhobenen Daten sprechen entweder für eine Inhibition mitogener Signale auf der Post-Rezeptorebene oder für einen Defekt in den Zellteilungsmechanismen selbst. Ein deutlich erhöhter Anteil von Tangier-Fibroblasten arretiert in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Zellen, die sich in der G2/M-Phase befinden, sind gegenüber den anderen Zellen deutlich vergrößert, was mit der im Durchschnitt erhöhten Zelloberfläche der Tangier-Fibroblasten zusammenhängt [Drobnik et al. (1999)]. Monensin, ein Na^+ -Ionophor, der allgemein als Inhibitor der Golgi-Funktion bekannt ist, verursacht in Kontrollzellen einen Anstieg in der G2/M-Phase bei gleichzeitiger Reduktion in der S-Phase. Diese Induktion eines Tangier-Phänotyps in Kontrollzellen, legt die Vermutung nahe, dass die Wachstumsarretierung bei Tangier-Fibroblasten mit einer gestörten Golgi-Funktion zusammenhängt. Ein Indiz dafür ist, dass Fibroblasten und MNPs von Tangier-Patienten eine Dilatation der Trans-Golgi-Zisternen aufweisen, die eine typische morphologische Veränderung darstellt. Monensin verursacht nicht nur diese morphologische Veränderung der Golgi-Dilatation, sondern inhibiert die Retroendozytose von HDL [Kambouris et al.(1990)], den Transport von neu synthetisiertem SPM und GluCER [Madison and Howard (1996)] und in Kontroll-Fibroblasten eine Verminderung des HDL₃-vermittelten Lipid-Effluxes.

In Tangier-Fibroblasten ist zudem die Ceramid-Konzentration zweifach erhöht. Ceramid ist als negativer Regulator des Zellwachstums beschrieben und induziert in Zellen ebenfalls eine Dilatation des trans-Golgi [Linardic et al. (1996)]. Außerdem ist Ceramid als Negativ-Regulator der PLD beschrieben. Ceramid induziert seinen Effekt auf das

Zellwachstum über die Dephosphorylierung des Retinomablastoma (Rb)-Gen Produkts. Gerade in diesen Prozess ist CDC42 als Signaltransduktor involviert. In diesem Kontext bleibt zu erwähnen, dass CDC42 in Hefe für den G2/M-Phasen-Übergang verantwortlich ist, so dass eine verminderte Expression von CDC42 in die Störung des Wachstums und des Zellzyklus in Tangier involviert sein könnte.

Für die Integrität des Golgi und dem vesikulären Transport vom Golgi ist, zusammen mit den Strukturelementen, CDC42 Teil des Multi-Protein-Komplexes, der für den intrazellulären Protein- und Phospholipidtransport verantwortlich ist. Weitere Proteine, die in diesen Prozess involviert sind, wie die Gi-Proteine, die ARF-Proteine und das PI-TP, zeigen in Tangier eine normale Expression ihrer Transkripte, so dass angenommen werden kann, dass die gestörte Signaltransduktion in Tangier nicht in strukturellen Defekten, sondern in einer veränderten Regulation begründet ist [Drobnik et al. (1999)].

5.3.2. Expression von CDC42 in Tangier-Monozyten und Fibroblasten

Wie eingehend erläutert, stellt CDC42 einen potentiellen Regulator der in Tangier gestörten Prozesse dar. Auf Northern Blot-Ebene wurde zwischen Tangier- und Kontroll-Fibroblasten kein Unterschied in der basalen Expression von CDC42 gefunden. Auf Western-Blot-Ebene hingegen wurde im Gesamtprotein eine verminderte Expression in Tangier-Fibroblasten detektiert. Nach Auftrennung des Gesamtproteins in eine zytosolische und eine Gesamtmembranfraktion wurde in Tangier eine vorwiegend zytosolische Anreicherung vom CDC42-Protein detektiert, wohingegen die CDC42-Fraktion in Kontroll-Zellen zu 80% in der Membranfraktion akkumuliert. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass CDC42 in Tangier im Zytosol in einer inaktivierten Form vorliegt, da die Bindung an Membranen ein Indiz für seine Aktivität darstellt. Dieser Sachverhalt konnte nach der Subfraktionierung in verschiedene Membrankompartimente bestätigt werden. In Kontrollzellen liegt CDC42 ausschließlich Membran gebunden vor. Hingegen findet sich CDC42 in Tangier-Fibroblasten mit einem hohen Proteinanteil im Zytosol, wobei die Proteinkonzentration an den Membranen abnimmt. Hier ist die Lokalisation von CDC42 an der PM und der lysosomalen Membranfraktion am höchsten. Diese Befunde zeigen, dass CDC42 in Tangier einer gestörten Prozessierung unterliegt, da dort ein hoher Anteil zytosolisch verbleibt und somit nicht an Membranen binden kann. Diese Untersuchungen sind Indizien dafür, dass CDC42 an den gestörten Prozessen der Signaltransduktion in Tangier beteiligt sein könnte. Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen vom IQGAP-Protein in Tangier bestätigen diese Aussage. Sowohl auf Transkriptions- als

auch auf Translations-Ebene wurde in Tangier gegenüber den Kontrollen eine erhöhte Expression von IQGAP gezeigt. Die erhöhte Expression von IQGAP in Tangier könnte als kompensatorischer Effekt auf die gestörte Prozessierung von CDC42 in Tangier-Fibroblasten angesehen werden.

In Tangier-Monozyten konnte in einem Vergleich zwischen Tangier- und Kontroll-Probanden eine erniedrigte Expression von CDC42 sowohl in der Western-Blot- als auch in der Flow-Zytometrischen-Analyse gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Publikation von Hirano et al. [Hirano et al. (2000)] überein, die sowohl in Tangier-Fibroblasten als auch in Tangier-Monozyten nach cDNA-Substraktions-Technik eine gegenüber Kontrollen, verminderte CDC42-Expression gefunden haben.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit die nach M-CSF-Stimulation induzierte und kontinuierlich ansteigende CDC42-Expression in Kontroll-Monozyten in Tangier-Monozyten nicht beobachtet werden. Hier scheint es eher so zu sein, dass CDC42 keinen Anstieg, sondern sogar einen leichten Abfall in seiner Expression nach M-CSF-Stimulation zeigt. Im Einklang mit der verminderten Expression von CDC42 in Tangier stehen die kürzlich publizierten Daten von Utech et al. [Utech et al. (2001)], die eine Akkumulation von RhoA, RhoB, RhoG und Rac1 in Tangier-Fibroblasten zeigen. Es konnte, wie bei CDC42, kein struktureller Defekt bei den anderen Proteinen aus der Rho-Familie festgestellt werden. Die erhöhte Expression der Rho-Proteine und Rac1 in TD-Fibroblasten könnte ein kompensatorischer Effekt sein, der die ABCA1-Defizienz und die verminderte CDC42-Expression auszugleichen versucht.

5.3.3. ABCA-1, das Zytoskelett und CDC42

Neben dem gestörten intrazellulären Phospholipid- und Cholesterintransport, in den ABCA-1 in seiner Funktion als Transport-Protein beteiligt ist, weisen, wie eben beschrieben, die TD-Zellen eine Reihe von morphologischen Veränderungen auf. Da diese Zytoskelett Veränderungen alle Rho-Protein abhängig sind, stellt sich angesichts der Hypothese, dass hier ein funktioneller Bezug zur ABCA-1-Defizienz herzustellen gilt, die Frage, ob ein Bindeglied zwischen den ABC-Transportern und dem Zytoskelett besteht. In diesem Zusammenhang stellen Proteine aus der Familie der Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) das Bindeglied zwischen dem Aktinzytoskelett und Proteinen der PM dar. Sie verbinden kortikale Aktinfilamente mit der PM und sind beteiligt in der Formation von Mikrovilli, Zelladhäsion-Komplexen, Membranausstülpungen und mehr [Sato et al. (1992); Tsukita and Yonemura et al.

(1999); Bretscher (1999)]. Das C-terminale Ende der ERM-Proteine bindet F-Aktin über die Aktin-Bindungsstellen, welche C-terminal 34 AS umfassen und hoch konserviert in diesen Proteinen vorliegen [Turunen et al. (1994)]. Weitere Aktin-Bindungsstellen konnten in diesen Proteinen identifiziert werden, die N-terminal und in der Mitte der Proteine lokalisiert sind, die ebenfalls F-Aktin und G-Aktin binden können [Roy et al. (1997)]. Short et al. [Short et al. (1998)] konnten zeigen, dass das EBP-50 (ERM-binding Phosphoprotein) mit dem CFTR (Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator), dem Prototyp der ABC-Transporter aus der ABCC-Subfamilie interagiert. Hier liegt die funktionelle Assoziation zwischen PM-Transportern und dem Zytoskelett begründet. Das bedeutet, dass die ERM-Proteine als Linkermoleküle zwischen den ABC-Transportern und den Aktin-Filamenten fungieren. An der Regulation der Aktivität der ERM-Proteine sind die Proteine der Rho-Familie beteiligt. In permeabilisierten Fibroblasten können Stressfibers, Focal Adhäsionen und periphere Aktin-Strukturen durch die Zugabe von GTP γ S und nachfolgender Aktivierung der Rho-Proteine induziert werden. Werden die Fibroblasten zunächst permeabilisiert und später die Nukleotide zugegeben, werden die erwähnten Zytoskelett Elemente nicht ausgebildet. In diesem Ansatz konnten nach Zugabe von rekombinanten ERM-Proteinen die Aktin-Strukturen wieder rekonstituiert werden [Mackay et al. (1997)].

Werden lebende BHK-Zellen mit C3-Toxin behandelt, translozieren die unlöslichen ERM-Proteine ins Zytosol und verlieren ihre Bindung an CD44, welches als Membranbindungspartner für die ERM-Proteine an der PM gilt. Im Gegensatz dazu wird die Bindung dieses Komplexes durch die Zugabe von 4,5-PIP₂ dramatisch verstärkt. Das bedeutet, dass die Regulation der Ausbildung des Zytoskeletts an der PM von Rho-Proteinen und dem Phosphatidylinositol-Turnover abhängt [Hirano et al. (1996)].

In einer anderen Studie in Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die durch konstitutiv aktiviertes CDC42-induzierte Filopodien-Ausbildung mit der Phosphorylierung der ERM an C-terminalen Threoninen einhergeht. In Kontrollzellen ist der Phosphorylierungsgrad dieser Proteine schwach ausgeprägt und die ERM-Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert, während sie nach Induktion durch CDC42 an der Spitze der Filopodien detektiert werden. Als Effektor-Protein von CDC42 gilt in diesem Fall die Myotonic Dystrophy-Related CDC42-Binding-Kinase (MRCK), die die ERM-Proteine in den Filopodien phosphoryliert [Nakamura et al. (2000)].

Die Hypothese, dass CDC42 mit ABCA1 in funktioneller Beziehung steht, kann durch dieselbe Regulation beider Proteine nach Cholesterin-Beladung und Entladung unterstrichen werden. Sowohl ABCA1 als auch CDC42 werden durch Cholesterin-

Entladung herunterreguliert und durch Cholesterin-Beladung hoch reguliert [Langmann et al. (1999); Orso et al (2000), eigene Daten]. Beide Proteine könnten somit in der Signaltransduktionskaskade potentiell interagieren.

5.3.4. Spreading und Adhärenz von Tangier-Monozyten

Das M-CSF-induzierte Spreading von Tangier-Monozyten ist im Vergleich zu den Kontroll-Monozyten reduziert. Diese Verminderung ist in den ersten drei Tagen der *in vitro*-Kultur deutlich zu beobachten und gleicht sich nach dieser Kultivierungsdauer dem Spreading der Kontrollzellen immer mehr an, erreicht aber nicht das ganze Ausmaß. Interessanterweise lässt sich dieses Phänomen auch bei Zellen, die das dominant negative CDC42-Konstrukt exprimieren, ebenfalls beobachten. Es scheint nach Defizienz des CDC42-Proteins einen CDC42-unabhängigen Mechanismus zu geben, der nach Ausfall dieses Proteins aktiviert wird.

Die gestörte M-CSF induzierte Antwort in Tangier-Monozyten beschränkt sich nicht nur auf ein verzögertes Spreading. Es wird eine verminderte Hochregulation aller β 1- und β 2-Integrine beobachtet, wobei die Verminderung bei CD11a und CD11b am stärksten ausgeprägt ist. Auch die Scavenger-Rezeptoren CD36 und CD163 zeigen eine verringerte Expression während der M-CSF-Induktion im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit weiteren Untersuchungen am Institut, die eine veränderte *in vitro*-Differenzierung des phagozytischen Phänotyps als Antwort auf die M-CSF-Stimulation zeigen. Ein weiteres, in Raft-Membranen assoziiertes Oberflächen-Antigen, der LPS-Rezeptor CD14, zeigt ebenfalls eine verminderte Expression in der *ex-vivo*-Immunophänotypisierung von Tangier-Monozyten. Somit zeigen zwei Raft-assoziierte Antigene, CD36 und CD14, eine veränderte Expression in ABCA-1-defizienten Monozyten. Zudem zeigen diese Monozyten gegenüber den Kontrollen eine erhöhte Expression der Oberflächenmoleküle, die charakteristisch für eine dendritische Differenzierung sind. Aber hier werden auch nicht alle für diesen Phänotyp charakteristischen Marker gleichermaßen hoch reguliert, sondern nur CD40 und HLA-DR, das heißt, dass auch hier eine abnorme dendritische Differenzierung stattfindet [Orso, Mitteilung]. Diese Veränderungen könnten mit dem Targeting dieser Monozyten in lymphoiden Organen zusammenhängen, was in Tangier zur Splenomegalie und den vergrößerten Tonsillen führen kann. Es wird also einmal eine verzögerte M-CSF-induzierte Differenzierung mit verglichen zu den Kontrollen, veränderten Monozyten-Subpopulationen und zum anderen eine veränderte Dendriten-ähnliche Differenzierung beobachtet. Diese Beobachtungen könnten mit der veränderten Raft- und Caveolae-

Organisation in Tangier korrelieren. Die gestörte Raft-Integrität und das verminderte Spreading könnte hypothetisch in Zusammenhang stehen mit dem verminderten Targeting der ABCA-1-defizienten Monozyten zur Gefäßwand, da die meisten der Tangier-Patienten kein erhöhtes Arteriosklerose-Risiko zeigen.

Das verminderte M-CSF-induzierte Spreading steht im Einklang mit den Beobachtungen eines veränderten Aktin-Zytoskeletts in Tangier-Fibroblasten und Monozyten [Hirano et al. (2000)]. Im Einklang mit Ergebnissen am hiesigen Institut [Drobnik et al. (1999)] konnte zunächst eine vergrößerte Zelloberfläche bei Tangier-Fibroblasten gezeigt werden. Weiter wurde gezeigt, dass die Aktin-Bündel diffus strukturiert sind, und zudem der Zellsaum scharf abgegrenzt ist gegenüber den Kontroll-Fibroblasten, die Spike-Formationen zeigen. Diese Beobachtung wird bestätigt von Untersuchungen im Konfokalen-Laser-Mikroskop, nachdem TD-Fibroblasten eine diffuse Organisation der Aktin-Filamente an den Zellausläufern gegenüber der definierten Filament-Anordnung in Kontrollzellen aufweisen [Orso, Mitteilung].

Die Monozyten der TD-Patienten zeigen auch bei Hirano et al. eine verminderte Filopodien-Formation. Diese Beobachtungen lassen sich gut mit der verminderten CDC42-Expression in TD erklären, so dass angenommen werden kann, dass die veränderte CDC42-Expression mit einer veränderten Aktin-Zytosklett-Organisation einhergeht. Das bereits verminderte Spreading der TD-Monozyten läßt sich weder durch HDL₃ noch durch apoA-I signifikant weiter reduzieren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der regulatorische Cholesterin-Pool in TD-MO unter unstimulierten Bedingungen depletiert ist, wohingegen in Kontroll-MO dieser Zustand erst nach der Depletion durch HDL₃ oder apoA-I erreicht wird. Dies steht im Zusammenhang mit dem schon diskutierten Modell, dass dieser Cholesterin-Pool in den Raft-Domänen lokalisiert ist. Und gerade diese sind in TD durch eine gestörte Prozessierung charakterisiert, wonach TD-Zellen an der PM eine reduzierte Anzahl der Caveolae aufweisen.

Diese Hypothesen werden von der Arbeitsgruppe um Hirano et al. weiter bestätigt, da deren Untersuchungen zeigten, dass die Expression von ABCA1 in HEK293 Zellen zu einer vermehrten Bildung von Filopodien und langen Membranprotrusionen führt [Tsukamoto et al. (2001)]. Diese morphologischen Veränderungen ähnelten jenen, die durch die Transfektion eines dominant-aktiven CDC42 erzielt wurden. Zusammen mit dem Nachweis einer physikalischen Interaktion von ABCA1 und CDC42 schlossen die Autoren auf eine Funktion von ABCA1 in der Formation von Membranextensionen. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen, sowie den Arbeiten der japanischen Arbeitsgruppe, kann folgende Hypothese formuliert werden: ABCA1 hat eine

grundlegende Funktion in der Translokation von Lipiden zu speziellen Plasmamembrandomänen, welche dem Aufbau von Membranprotrusionen dienen. In Anwesenheit von apoA-I werden diese Lipide im Rahmen des Lipidefflux auf das Apolipoprotein transferiert und stehen so nicht mehr für den Aufbau der Extensionen zur Verfügung. Es resultiert eine verminderte Bildung von Filopodien und Membranprotrusionen in Gegenwart von apoA-I bzw. HDL₃.

Darüber hinaus ist von Interesse in diesem Zusammenhang, dass zellpermeables C2-Ceramid das Spreading in Kontroll-Monozyten ebenfalls inhibieren kann und die M-CSF-induzierte CDC42-Expression supprimiert. Da Tangier-Zellen eine erhöhte intrazelluläre Ceramid-Konzentration aufweisen, könnte das ein weiteres Indiz für das reduzierte Spreading der TD-Zellen sein. Außerdem konnte in monozytären Zelllinien gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$, welcher als Agonist die zelluläre Ceramidkonzentration erhöht, und C2-Ceramid selbst, die CDC42-induzierte Filopodien inhibiert [Peppelenbosch et al (1999)].

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Cholesterin-Efflux und der Regulation der Zellmigration durch CDC42 in der frühen Phase der Arteriosklerose hergestellt werden. Es sollte ein zentrales Element in der Signaltransduktionskaskade im Cholesterin-Stoffwechsel identifiziert werden, welches sowohl durch die Cholesterinhomöostase reguliert als auch in der seltenen Tangier-Erkrankung eine Bedeutung erhält. Als Zielproteine galten die Proteine der Rho-Familie, die über ihr Wirkprinzip und ihre Regulation eine Schaltstelle in der Zelle darstellen. Diese G-Protein-gekoppelten Proteine können sowohl zwischen Zellen über Rezeptoren Signale vermitteln als auch in der Zelle an den verschiedensten Prozessen, z. B. des Proteintransportes oder der Zellbeweglichkeit, beteiligt sein.

CDC42 konnte in dieser Zusammenschau als dasjenige Protein identifiziert werden, welches einerseits durch den Cholesterinefflux reguliert, andererseits in Tangier-Zellen eine supprimierte Expression aufweist.

Die Regulation der Migration, der Chemotaxis und der Adhärenz durch HDL, die mit der Regulation der CDC42-Proteinexpression durch HDL korreliert, weist auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Cholesterinstoffwechsel und der Zellregulation hin. Die durch die HDL-induzierte Signaltransduktion gesteuerten antiinflammatorischen Ereignisse spielen neben dem reversen Cholesterintransport eine wichtige Rolle für die antiatherogene Wirkung des HDL. Die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen bieten mögliche Erklärungsansätze für die hemmende Funktion von apoA-I und HDL₃ auf die Bildung von Membranprotrusionen und die Migration von Monozyten. Der dargestellte Zusammenhang zwischen dem Cholesterinefflux und der Zellregulation könnte zumindest für einen Teil, der in der Einleitung unter Punkt 1.1.4. beschriebenen zellulären HDL-Effekte, von Bedeutung sein.

Die hierbei zu Grunde liegenden Mechanismen konnten durch den Einfluss von apoA-I und HDL₃ auf die Expression und die Aktivität von CDC42 gezeigt werden. CDC42 ist essentiell an der Bildung von Membranprotrusionen in Form von Filopodien und der damit einhergehenden Restrukturierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Sowohl apoA-I als auch HDL₃ vermindern die Proteinexpression und Aktivität von CDC42. Diese Ergebnisse deuten auf eine Involvierung von CDC42 in der apoA-I, bzw. HDL₃ vermittelten Hemmung der Zellmigration und der Bildung von Membranprotrusionen hin.

Zusammenfassend liefern die Daten einen vernünftigen Beweis dafür, dass die Modulation des zellulären Cholesterin-Pools mit dem Spreading-Verhalten, der Chemotaxis und auch der Expression der für Adhäsion relevanten Oberflächen-Moleküle auf Monozyten in funktioneller Beziehung steht.

Während dieser Arbeit wurde am hiesigen Institut der genetische Defekt der Tangier-Erkrankung als Mutation im ABCA-1-Protein aufgedeckt und ABCA1 als zentraler Regulator des HDL-Stoffwechsels identifiziert.

Im Zusammenhang mit der antiarteriosklerotischen Funktion von ABCA1 in Makrophagen steht der Einfluss von apoA-I und HDL₃ auf die Migration von Monozyten. Die gezeigten Ergebnisse sprechen für eine kausale Beteiligung des ABCA1 vermittelten Cholesterinefflux an den durch apoA-I und HDL₃ bewirkten Effekten. Erstaunlich war, dass die hemmenden Wirkungen von apoA-I, HDL₃ und p-Cyclodextrin auf das Zellspreading, trotz unterschiedlich starker Stimulation des Cholesterinefflux, annähernd gleich waren. Es könnte deshalb sein, dass die Depletion spezifischer zellulärer Cholesterinkompartimente an der Vermittlung der Effekte beteiligt war. ABCA1 defiziente Tangier-Fibroblasten zeigen gegenüber Kontrollfibroblasten eine verminderte CDC42 Expression sowie ein reduziertes Zellspreading. Diese Befunde stehen im Einklang mit publizierten Ergebnissen, wonach ebenfalls eine verminderte CDC42 Expression in Tangier-Zellen gefunden wurde. Zusammen mit dem Nachweis einer physikalischen Interaktion von ABCA1 und CDC42 schlossen die Autoren auf eine Funktion von ABCA1 in der Formation von Membranextensionen. Aufbauend auf den eigenen Ergebnissen, sowie publizierter Daten, kann folgende Hypothese formuliert werden: ABCA1 hat eine grundlegende Funktion in der Translokation von Lipiden zu speziellen Plasmamembrandomänen, welche dem Aufbau von Membranprotrusionen dienen. In Anwesenheit von apoA-I werden diese Lipide im Rahmen des Lipidefflux auf das Apolipoprotein transferiert und stehen so nicht mehr für den Aufbau der Extensionen zur Verfügung. Es resultiert eine verminderte Bildung von Filopodien und Membranprotrusionen in Gegenwart von apoA-I bzw. HDL₃.

Diese zellulären Ereignisse werden im Rahmen der zellulären Signaltransduktion durch CDC42 reguliert.

7. Literaturverzeichnis

a) Einleitung

Abdul-Manan N., Aghazadeh B., Liu G.A., Majumdar A., Ouerfelli O., Siminovitch K.A., Rosen M.K. (1999), Structure of CDC42 in complex with the GTPase-binding domain of the Wiskott-Aldrich syndrom protein, *Nature* **399**: 379-383

Aelst V. and D'Souza-Schorey (1997), Rho-GTPases and signaling networks, *Genes&Develop* **11**: 2295-2322

Aepfelbacher M., Essler M., Huber E., Czech A., Weber P.C. (1996), Rho is a negativ regulator of human monocyte spreading, *J Immunol* **157(11)**: 5070-75

Aepfelbacher M., Vauti F., Weber P.C., and Glomset J.A., (1994), Spreading of differentiating human monocytes is associated with a major increase in membrane-bound CDC42, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**: 4263-4267

Allen W.E., Jones G.E., Pollard J.W., Ridley A.J. (1997), Rho, Rac and CDC42 regulate actin organisation and cell adhesion in macrophages, *J. Cell Science* **110**: 707-720

Allen W.E., Jones G.E., Pollard J.W., Ridley A.J., Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages, *J.Cell Sci.* 1997; **110**: 707-720

Allen W.E., Zicha D., Ridley A.J., Jones G.E. (1998), A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis, *J.Cell Biol.*, **141**: 1147-1157

Antonelli-Orlidge A., Saunders K.B., Smith S.R., Dámore P.A. (1990), An activated form of TGF- β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 4544-4548

Antonny B., Beraud-Dufour S., Chardin P., Chabre M. (1997), N-terminale hydrophobic residues of the G-Protein ADP-ribosylationfactor-1 insert into mebrane phospholipids upon GDP to GTP exchange, *Biochemistry* **36(15)**: 4675-84

Ashby D.T., Rye K.A., Clay M.A., Vadas M.A., Gamble J.R., Barter P.J. (1998), Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothel cells, *ATVB* **18(9)**: 1450-1455

Aspenström P. (1999), The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton, *Exp. Cell. Res.* **246**: 20-25

Assmann G., Schmitz G., Heckers H. (1978), Lecitin-cholesterol acyltransferase in Tangier disease, *Adv Exp Med Biol* 38:98

Assmann G., von Eckardstein A., Brewer H.B.J. (1990), Familial High Density Lipoprotein Deficiency: Tangier Disease, In *Metabolic Bases of inherited Disease* (Edited by Scriver C.A., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.), p. 2053, McGraw-Hill, New York

Assmann G., von Eckardstein H., Funke H. (1990b), Apolipoprotein A-I and HDL Deficiency, *Curr. Opin. Lipidol.* **1**: 110-115

Ayscough K.R. (1998), In vivo functions of actin-binding proteins, *Curr Opin Cell Biol* **10**: 102-111

- Baker P.W., Rye K.A., Gamble J.R., Vadas M.A., Barter P.J. (2000), Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influence their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression, *J Lipid Res* **41(8)**: 1261-1270
- Baker P.W., Rye K.A., Gamble J.R., Vadas M.A., Barter P.J., (1999), Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells: *J Lipid Res*, **40**, 345-353
- Bar-Sagi D. and Hall A. (2000), Ras and Rho-Proteine: A family reunion, *Cell* **103**: 227-238
- Bauer B.E. Wolfger H. Kuchler K. (1999), Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 217-236
- Baumberger C., Ulevitch R.J., Dayer J.M. (1991), Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein, *Pathobiology* **59**: 378-383
- Beekhuizen H. and van Furth R. (1993), Monocyte Adherence to Human Vascular Endothelium, *Behring Inst. Mitt.* **92**: 63-86
- Berliner J. A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S. et al. (1995), Atherosclerosis: basic mechanism: oxidation, inflammation, genetics *Circulation* **91**:2488-2496
- Berliner J. A., Territo M.C., Sevanian A. et al. (1990), Minimally modified low density lipoproteins stimulates monocyte endothelial interaction, *J.Clinic.Invest.* **85**: 1260-1266
- Bhakdi S. (1998), Complement and atherogenesis: the unknown connection, *Ann. Med.* **30**: 503-507
- Bhakdi S. (1998), Eine alternative Hypothese zur Pathogenese der Atherosklerose, *Herz* **23**: 163-167
- Bhakdi S., Dorweiler B., Kirchmann R. et al. (1995), On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low-density lipoprotein to an atherogenic moiety, *J. Exp Med* **182**: 1959-1971
- Bist A., Fielding P.E., Fielding C.J. (1997), Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10693-10698
- Blackburn W.D.J., Dohlman J.G., Venkatachalapathi Y.V., Pillion D.J., Koopman W.J., Segrest J.P., Anantharamaiah G.M., (1991), Apolipoprotein A-I decreases neutrophil degranulation and superoxide production, *J. Lipid. Res.* **32**: 1911-1918
- Blanchette-Mackie E.J. and Scow R.O. (1983), Movement of lipolytic products to mitochondrien in brown adipose tissue of young rats: an electron microscopy study, *J. Lipid. Res.* **24**: 229-244
- Bodzioch M., Orsó E., Klucken J., Böttcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Büchler C., Porsch-Özcürümez M., Kaminski W.E., Hahmann H.W., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner K.J., Schmitz G. (1999), The ATP binding cassette transporter-1 gene (*ABCA1*) is mutated in familial HDL deficiency (Tangier disease). *Nat Genet* **22**:347-351
- Boivin D. and Beliveau R. (1995), Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am.J.Physiol.* **269**: F180-F189
- Bojanovski D., Gregg R.E., Zech L.S. et al. (1987), In vivo metabolism of proapolipoprotein A-I in Tangier disease, *J.Clin.Invest.* **80**: 1742-1747

- Bokoch G.M. (2000), Regulation of cell function by Rho family GTPases, *Immunol Res*, **21(2-3)**: 139-48
- Boman L.A. and Kahn R.A. (1995), Arf proteins: the membran traffic police?, *Trends Biochem. Sci.* **20(4)**: 147-150
- Bräsen J.H. und Niendorf A.(1997), Atherosklerose, *Pathologe* **18**: 218-227
- Broccardo C., Luciani M., Chimini G. (1999), The ABCA subclass of mammalian transporters, *Biochim Biophys Acta* **1461**:395-404
- Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee S.M., Zhang L.H., Roomp K., van Dam M., Yu L., Brewer C., Collins J.A., Molhuizen H.O., Loubser O., Ouelette B.F., Fichter K., Ashbourne-Excoffon K.J., Sensen C.W., Scherer S., Mott S., Denis M., Martindale D., Frohlich J., Morgan K., Koop B., Pimstone S., Kastelein J.J., Genest J., Hayden M.R., (1999), Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, **22**:336-345
- Brousseau M.E., Schaefer E.J., Dupuis J., Eustace B., van Eerdewegh P., Goldkamp A.L., Thurston L.M., FitzGerald M.G., Mc Kenna D.Y., O'Neill G., Eberhart G.P., Weiffenbach B., Ordovas J.M., Freeman M.W., Brown R.H., Gu J.Z. (2000), Novel mutations in the gene encoding ATP-binding cassette 1 in four Tangier disease kindreds, *J Lipid Res.* **41**: 433-441
- Brown M. and Goldstein J.L. (1986); A receptor mediated pathway for cholesterol homeostase, *Science* **232**: 34-47
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1983), Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, *Annu. Rev. Biochem* **52**: 223-261
- Brown M.S., Dana S.E., Goldstein J.L. (1973); Regulation of β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-reduktase activity in human fibroblasts by lipoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 2162-2166
- Calabresi L., Franceschini G., Sirtori C.R., De Palma A., Saresella M., Ferrante P., Taramelli D., (1997), Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins: *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 61-65
- Carlier M.F. (1998), Control of actin dynamics, *Curr Opin Cell Biol* **10**: 45-51
- Caron E. and Hall A. (1998), Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different rho GTPases, *Science* **282(5394)**: 1717-21
- Casas A.T., Hubsch A.P., Rogers B.C., Doran J.E. (1995), Reconstituted high-density lipoprotein reduces LPS-stimulated TNF alpha, *J Surg Res* **59(5)**: 544-52
- Channing C.J. and Balch W.E. (2000), GTPase traffic control, *Nature (letter)* **405**: 749-752
- Clark E.A., King W.G., Brugge J.S., Symons M., Hynes R.O. (1998), Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J.Cell Biol.*, **142**: 573-586
- Clarkson T.B., Weingard K.W., Kaplan J.R., Adams M.R.(1976), Mechanisms of atherosclerosis, *Circulation* **76(1)**: 20-28
- Cockcroft S. (1998), Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic, *BioEssays* **20**: 423-432
- Cockerill G.W., Rye K.A., Gamble J.R., Vadas M.A., Barter P.J., (1995), High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 1987-1994

- Cockerill G.W., Saklatvala J., Ridley S.H., Yarwood H., Miller N.E., Oral B., Nithyanathan S., Taylor G., Haskard D. O. (1999), High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-Selectin and Cyclooxygenase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 910-917
- Collins T. (1993), Endothelial nuclear factor κ B and the initiation of the atherosclerosis, *Lab. Invest.* **68**: 499-508
- Conrad P.A., Smart E.J., Ying Y.S., Anderson G.W., Bloom G.S. (1995), Caveolin cycles between Plasma Membran Caveolae and the Golgi Complex by Microtubule-dependent and Microtubule-independent steps, *J Cell Biol* **131(6)**: 1421-1433
- Consigny P.M. (1994), Pathogenesis of atherosclerosis, *Am. J. Roentgenol.* **164**: 553-558
- Coso O.A., Chiariello M., Yu J.C. et al. (1995), The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146
- Cotran R.S. and Mayadas-Norton T. (1998), Endothelial adhesion molecules in health and disease, *Pathol Biol (Paris)*, **46**, 164-170
- Crawford A.R., Smith A.J., Hatch V.C., Oude Elferik R.P., Borst P., Crawford J.M. (1997), Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on MDR2 or MDR3 p-glycoprotein expression. Visualisation by electron microscopy, *J. Clin. Invest.* **100**: 2562-2567
- Cushing S.D., Berliner J.A. Valente A.J. et al. (1990); Minimally modified low density lipoproteins induces monocyte chemotactic protein in human endothelial cells and smooth muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5134-5138
- Cybulsky M.I. and Gimbrone M.A. (1991), Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherosclerosis, *Science* **251**: 788-791
- Dansky H.M., Charlton S.A., Barlow C.B., Tamminen M., Smith J.D., Frank J.S., Breslow J.L. (1999), Apo A-I inhibits foam cell formation in apoE-deficient mice after monocyte adherence to endothelium, *J. Clin. Invest.* **104**: 31-39
- Dart A.M. und Chin-Dusting J.P. (1999), Lipids and the Endothelium, *Cardiovasc. Res.* **43(2)**: 308-22
- Dawson T.C., Kuziel W.A., Osahar T.A., Maeda N. (1999), Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Atherosclerosis* **143(1)**: 205-11
- de Caterina R. (2000), Endothel dysfunction: common denominators in vascular disease, *Curr Opin in Lipidology* **11**: 9-23
- Dimayuga P., Zhu J., Oguchi S., Chyu K.Y., Xu X.H., Yano J., Shah P.K., Nilsson J., Cercek B. (1999), Reconstituted HDL containing human apo A-I reduces VCAM-1 Expression and Neointima formation following periaortic cuff-induced carotid injury in apoE Null mice, *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 465-468
- Drobnik W., Liebisch G., Biederer C., Trümbach B., Rogler G., Müller P., Schmitz G. (1999), Growth and cell cycle abnormalities in fibroblasts from Tangier Disease patients, *ATVB* **19**: 28-38
- Drobnik W., Möllers C., Resink T., Schmitz G. (1995), Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in Response to HDL₃ and LDL is markedly reduced in cultured fibroblasts from Tangier patients, *ATVB* **15**: 1369-1377

- Dunon D, Piali L, Imhof BA (1996) To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 714-723
- Dupree P., Parton R.G., Raposo G., Kurzchalia T.V., Simons K. (1993), Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells, *EMBO Journal* **12**(4): 1597-1605
- Eisenberg S. (1984), High density lipoprotein metabolism, *J. Lipid. Res.* **25**: 1017-1058
- Engelman J.A., Chu C., Lin A., Jo H., Ikezu T., Okamoto T., Kohtz D.S., Lisanti M.P., Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* 1998 **428**:205-211
- Erickson J.W., Cerione R.A., Hart M.J. (1997), Identification of an Actin Cytoskeletal Complex that includes IQGAP and the CDC42 GTPase, *J Biol Chem* **272**(39): 24443-447
- Erickson J.W., Zhang C., Kahn R.A., Evans T., Cerione R.A. (1996), Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus, *J.Biol.Chem.* **271**: 26850-26854
- Erickson J.W., Zhang C., Kahn R.A., Evans T., Cerione R.A. (1996), Mammalian CDC42 is a Brefeldin A-sensitive Component of the Golgi Apparatus, *J Biol Chem* **271**(43): 26850-54
- Falcone D.J., Hajjar D.P., Minick C.R. (1984), Lipoprotein and albumin accumulation in reendothelialized and deendothelialized aorta. *Am J Pathol* **114**:112-120.
- Fielding C.J. and Fielding P.E. (1995); Molecular physiology of reverse cholesterol transport, *J. Lipid Res.* **36**: 211-228
- Fielding C.J., Bist A., Fielding P.E. (1997), Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and downregulated by oxysterols in fibroblast monolayers, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 3753-3758
- Fielding P.E. and Fielding C.J. (1995), Plasma Membrane Caveolae mediate the Efflux of Cellular Free Cholesterol, *Biochemistry* **34**: 14288-14292
- Francis G.A., Knopp R.H., Oram J.F. (1995), Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease, *J. Clin. Invest.* **96**: 78-87
- Fredrickson D.S., Altrocchi P.H., Avioli L.V., Goodman D.S., Goodman H.C. (1961), Tangier disease, combined clinical staff conference at the National Institutes of Health, *Ann Intern. Med.* **55**: 11016-1031
- Frohlich J., Westerlund J., Sparks D., Pritchard P.H. (1990), Familial Hypoalphalipoproteinemias, *Clin. Invest. Med* **13**: 202-210
- Fukata M., Kuroda S., Fujii K., Nakamura T., Shoji I., Matsuura Y., Okawa K., Iwamatsu A., Kikuchi A., Kaibuchi K. (1997), Regulation of Cross-linking of Actin Filament by IQGAP, a Target for CDC42, *J Biol Chem* 272(47): 29579-583
- Fuster V., Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H. (1992), The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes, *New Engl. J. Med.* **326**: 242-250; 310-318
- Glomset J.A. and Farnsworth C.C. (1994), Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes, *Annu.Rev.Cell Biol.* **10**: 181-205
- Goldstein J and Brown M. (1977), The LDL-pathway and its relation to atherosclerosis, *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 897-930

- Goldstein J., Ho Y., Basu S. et al. (1979), Binding-site on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylLDL, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 333-337
- Goldstein J.L. and Brown M.S. (1990); Regulation of the mevalonate pathway, *Nature* **343**: 425-430
- Gordon T.L. and Johnson D.G., (1977), Study of U.S. medical school applicants, 1975-76: *J Med Educ*, **52**: 707-730
- Guo W., Sutcliffe M.J., Cerione R.S., Oswald R.E. (1998), Identification of the binding surface on CDC42HS for p21-activated kinase, *Biochemistry* **37**: 14030-14037
- Hall A. (1994), Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu.Rev.Cell Biol.* **10**: 31-54
- Hall A. (1998), Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton, *Science* **279**: 509-514
- Han K.H., Han K.O., Green S.R., Quehenberger, O. (1999), Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function: *J Lipid Res*, **40**,1053-1063
- Han K.H., Tangirala R.K., Green S.R., Quehenberger, O. (1998) Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1983-1991
- Harder T., Simons K. (1997), Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**:534-542
- Harter C. (1995), COP-coated vesicles in intracellular protein transport, *FEBS Letters* **369**: 89-92
- Hayden M.R., Clee S.M., Brooks-Wilson A., Genest J. Jr., Attie A., Kastelein J.J. (2000), Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, *Curr Opin Lipidol* **11(2)**: 117-22
- Herbert P.N., Forte T., heinen R.J. et al. (1978), Tangier disease: One explanation for lipid storage, *New Engl. J. Med.* **299**: 519-521
- Hessler J.R., Robertson A.L., Chisolm G.M. (1979), LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture, *Atherosclerosis* **32**: 213-229
- Higgins C.F. (1992), ABC transporter: from microorganisms to man, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**: 67-113
- Higgins C.F. (1994), Flip-flop: the translocation of lipids, *Cell* **79**: 393-395
- Hill S.A. and Mc Queen M.J. (1997), Reverse cholesterol transport-a review of the process and its clinical implications, *Clin. Biochem.* **30(7)**: 517- 525
- Hui D.Y. (1996), Molecular biology of enzymes involved with cholesteryl ester hydrolysis in mammalian tissues, *Biochim Biophys Acta*, **1303**: 1-14
- Hurt-Camejo E., Camejo G., Rosengren B. et al. (1992), Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* **12**:569-583.

- Hurt-Camejo E., Olsson U., Wiklund O., Bondjers G., Camejo G. (1997) Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:1011-1017
- Ikonen E. (1997), Molecular mechanisms of intracellular Cholesterol transport, *Curr Opin in Lipidology* **8**: 60-64
- Imhof B.A. and Dunon D. (1995), Leukocyte Migration and Adhesion, *Advances in Immunology* **38**: 345-416
- Ishibashi S., Goldstein J.L., Brown M.S., Herz J., Burns D.K. (1994), Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* **93**:1885-1893.
- Jensen S.J., Sulman E.P., Maris J.M., Matise T.C., Vojta P.J., Barrett J.C., Brodeur G.M., White P.S. (1997), An integrated transcript map of human chromosome 1p35-p36, *Genomics* **42**: 126-136;
- Johnson D.I. (1999), CDC42: an essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity, *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1): 54-105
- Johnson W.J., Mahlberg F. H., Rothblatt G.H., Phillips M.C. (1991); Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* **1085**: 273-298
- Jones G.E., Allen W.E., Ridley A.J. (1998), The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis, *Cell Adhesion Comm* **6**(2-3): 237-245
- Kaibuchi K., Kuroda S., Amano M. (1999), Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells, *Annu Rev Biochem* **68**: 459-86
- Kashyap M.L. (1998), Mechanistic studies of high-density lipoproteins, *Am. J. Cardiol* **82**: 42U-48U
- Keil U. (1990), Prävention der klassischen Risikofaktoren, *Drug Res.* **40**: 1-7
- Kirchhausen T., Bonifacino J.S., Riezman H. (1997), Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 488-495
- Kishimoto T., Taga T., Akira S. (1994), Cytokine signal transduction, *Cell* **76**: 253-262
- Klein I., Sarkadi B., Varadi A. (1999), An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1461**: 237-262
- Klouche M, Gottschling S., Gerl V., Hell W., Husmann M., Dorweiler G., Messner M., Bhakdi S. (1998), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 1376-1385
- Klouche M., May A.E., Hemmes M. et al. (1999), Enzymatically modified, non-oxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(3): 784-93
- Klucken J., Büchler C., Orsó E., Kaminski W.E., Porsch-Özcürümez M., Liebisch G., Kapinsky M., Diederich W., Drobnik W., Dean M., Allikmets R., Schmitz G., ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila white* gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 **97**:817-822
- Kozma R., Ahmed S., Best A., Lim L. (1995), The ras-related protein CDC42HS and Bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts, *Mol Cell Biol* **15**(4): 1942-1952

- Kozminski G.K., Chen A.J., Rodal A.A., Drubin D.G. (2000), Functions and functional domains of the GTPase CDC42p, *Mol Biol Cell* **11**: 339-354
- Krieger M. (1998), The best of cholesterol, the worst of cholesterol: a tale of two receptors [comment], *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4077-4080
- Kühn H., Heydeck D., Hugou I. et al. (1997), In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* **99**: 888-893
- Kume S., Takeya M., Mori T., Araki N., Suzuki H., Horiuchi S., Kodama T., Miyauchi Y., Takahashi K. (1995), Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel monoclonal antibody, *Am. J. Pathol.* **147**: 654-667
- Kunitake S.T., Young S.G., Chen G.C., et al. (1990), Conformation of apolipoprotein B-100 in the low density lipoprotein of Tangier disease, *J. Biol. Chem.* **265**: 20739-46
- Kuroda S., Fukata M., Kobayashi K., Nakafuku M., Nomura N., Iwamatsu A., Kaibuchi K. (1996), Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, CDC42 and Rac, *J Biol Chem* **271(38)**: 23363-367
- Kwiterovich P.O. (1998), The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol, *Am. J. Cardiol* **82**: 13Q-21Q
- Lagace T.A., Byers D.M., Cook H.W., Ridway N.D. (1997), Altered regulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis in Chinese hamster ovary cells overexpressing the OSBP is dependent on the pleckstrin homology domain, *Biochem. J.* **326**: 205-213
- Lange Y. (1991), Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts, *J. Clin. Invest.* **23**: 329-339
- Langmann T., Klucken J., Reil M., Liebisch G., Luciani M.F., Chimini G., Kaminski W.E., Schmitz G. (1999), Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 29-33
- Lawn R.M., Wade D.P., Garvin M.R., Wang X., Schwartz K., Porter J.G., Seilhammer J.J., Vaughan A.M., Oram J.F. (1999), The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway, *J. Clin. Invest.* **104**: R25-R31
- Lazar T., Götte M., Gallwitz D. (1997), Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?, *TIBS* **22**: 468-472
- Lechler T., Shevchenko A., Li R. (2000), Direct involvement of Yeast Type I myosins in the CDC42-dependent Actin Polymerisation, *J Cell Biol* **148(2)**: 363-373
- Lee C., Sigari F., Segrado T., Horkko S., Hama S., Subbaiah P.V., Navab M., Witztum J.L., Reaven P.D. (1999), All ApoB-containing lipoproteins induce monocyte Chemotaxis and adherence when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating-factor-acetylhydrolase, *ATVB* **19(6)**: 1437-46
- Leonard D.A., Lin R., Cerione R.A., Manor D. (1998), Biochemical studies of the mechanism of action of the CDC42-GTPase-activating protein, *J Biol Chem* **273(26)**: 16210-15
- Li H., Cybulsky M.I., Gimbrone M.A., Libby M. (1993), A atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule in rabbit aortic endothelium, *Arterioscler. Thromb* **13**: 197- 204

- Li R., Debrececi B., Jia B., Gao Y., Tigyi G., Zheng Y. et al. (1999), Localization of the PAK1-, WASP-, and IQGAP1-specifying regions of CDC42, *J. Biol. Chem.* **274(42)**: 29648-29654
- Liao F., Andalibi A., Lusis A.J., Fogelman A.M (1995), Genetic control of the inflammatory response induced by oxidized lipids, *Am. J. Cardiol.* **75(6)**: 65B-66B
- Liebisch G. (1999), Untersuchungen zur Bedeutung des Spingolipidstoffwechsels für die Zellregulation am Modell eines HDL- Defizienzsyndroms, *Dissertation Universität Regensburg*
- Linanmaki E., Leinonen M., Mattila K., Nieminen M.S., Valtonen V., Saikku P. (1993), Chlamydia pneumoniae-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease, *Circulation* **87**: 1130
- Liscovitch M. (1996), Phospholipase D: role in signal transduction and membran traffic, *J. Lipid. Med. Cell Signalling* **14**: 215-221
- Luciani M.-F., Denizot F., Savary S., Mattei M.G., Chimini G. (1994), Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* **21**:150-159
- Luker G.D., Nilsson K.R., Covey D.F., Piwnicka-Worms D. (1999), Multi drug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membran cholesterol, *J. Biol. Chem.* **274**: 6979-6991
- Machesky L.M. and Hall A. (1997), Role of Actin polymerisation and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganisation, *J Cell Biol* **138(4)**: 913-926
- Mackay D.J.G. and Hall A. (1998), Rho GTPases, *J Biol Chem* **273 (33)**: 20685-688
- Mackness M.I., Arrol P.N., Durrington P.N. (1991), Paraoxygenase prevents accumulation of lipidperoxides in low-density lipoprotein, *FEBS Lett.* **286**: 152-154
- Maier J.A., Barenghi L., Bradamante S., Pagani F. (1994), Modulators of oxidized LDL-induced hyperadhesiveness in human endothelial cells, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **204(2)**: 673-7
- Maier J.A., Barenghi L., Bradamante S., Pagani F., Compì P., Ragnotti G. (1994), The protective role of high-density lipoprotein on oxidized-low-density-lipoprotein-induced U937/endothelial cell interactions. *Eur. J. Biochem.* **221(1)**: 35-41
- Marcil M., Brooks-Wilson A., Clee S.M., Roomp K., Zhang L.H., Yu L., Collins J.A., van Dam M., Molhuizen H.O., Loubster O., Ouellette B.F., Sensen C.W., Fichter K., Mott S., Denis M., Boucher B., Pimstone S., Genest J. Jr, Kastelein J.J., Hayden M.R. (1999), Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* **354**:1341-1346
- Marks P.W. and Kwiatkowski D.J. (1996), Genomic organisation and chromosomale localisation of murine CDC42, *Genomics* **38**: 13-18
- Marsh M and McMahon H.A. (1999), The structural era of endocytosis, *Science* **285**: 215-220
- Marshall C.J., Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions, *Science* **259**: 1865-1867(1993)
- Massol P., Montcourrier P., Guillemot J-C., Chavrier P. (1998), Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1, *EMBO* **17(21)**: 6219-6229
- Mc Callum S.J., Erickson J.W., Cerione R.A. (1998), Characterization of the Assoziation of the Actin-binding protein IQGAP, and activated CDC42 with Golgi Membranes, *J Biol Chem* **273 (35)**: 22537-544

- McCallum S.J., Erickson J.W., Cerione R.A. (1998), Characterization of the association of the actin-binding protein, IQGAP, and activated Cdc42 with Golgi membranes, *J.Biol.Chem.* **273**: 22537-22544
- Mendez A.J. and Oram J.F. (1997), Limited proteolysis of and high-density lipoprotein abolishes its interaction with cell-surface binding sites that promotes cholesterol efflux, *Biochim. Biophys. Acta* **1346**: 285-299
- Mendez A.J., Oram J.F., Bierman E.L. (1991), Protein kinase C as a mediator of high-density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol, *J.Biol.Chem.* **266**: 10104-10111
- Minden A. and Karin M. (1997), Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim.Biophys.Acta* **1333**: F85-104
- Möller C., Drobnik W., Resink T., Gerd Schmitz (1995), High-density lipoprotein and low-density lipoprotein-mediated signaltransduktion in cultured human skin fibroblasts, *Cellular Signalling* **7(7)**: 695-707
- Mora R., Lupu F., Simionescu N. (1987), Prelesional events in atherogenesis: Colocalisation of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomen in the aorta of hyperlipidemic rabbit, *Athersclerosis* **67**: 143-145
- Morreale A., Venkatesan M., Mott H.R., Owen D., Nietlispach D., Lowe P.N., Laue E.D. (2000), Structure of CDC42 bound to the GTPase binding domain of PAK, *Nature Struc Biol* **7(5)**: 384-388
- Mott H.R., Qwen D., Nietlispach D., Lowe P.N., Manser E., Lim L., Laue E.D. (1999), Structure of the small G protein CDC42 bound to the GTPase-binding domain of ACK, *Nature* **399**: 384-388
- Moundry R., Spycher M. and Doran J. (1997), Reconstituted high density lipoprotein modulates adherence of polymorphonuclear leukocytes to human endothelial cells, *Shock*, **7**: 175-181
- Munemitsu S., Innis M.A., Clark R., McCormick F., Ullrich A., Polarkis P. (1990), Molecular cloning and expression of a G25K cDNA. The human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42, *Molec. Cell. Biol.* **10**: 5977-82
- Murakami T, Yamada N (1996) Modification of macrophage function and effects on atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **7**: 320-323
- Murata M., Peränen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T. V., Simons K. (1995), VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 10339-10343
- Myant N.B. (1990), Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor, *Academic Press Inc.* San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto
- Navab M., Fogelman A.M., Berliner J.A., Territo M.C., Demer L.L., Frank J.S., Watson A.D., Edwards P.A., Lusis A.J. (1995), Pathogenesis of atherosclerosis, *Am. J. Cardiol.* **76(9)**: 18C-23C
- Navab M., Hama S.Y., Hough G.P., Hedrick C.C., Sorenson R., La Du B.N., Kobashigawa J.A., Fonarow G.C., Berliner J.A., Laks H., Fogelman A.M., (1998), High density associated enzymes: their role in vascular biology: *Curr Opin Lipidol*, **9**, 449-456
- Nielsen L.B., Nordestgaard B.G., Stender S., Kjeldsen K. (1992), Aortic permeability to LDL as a predictor of aortic cholesterol accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb* **12**:1402-1409.

- Nishizuka Y. (1995), Protein Kinase C and lipid signalling for sustained cellular response, *FASEB J.* **9**: 484-496
- Nobes C.D. and Hall A. (1995), Rho, Rac, CDC42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell* **81**: 53-62
- Novick P. and Zerial M. (1997), The diversity of Rab proteins in vesicle transport, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 496-504
- Nowicka G., Brüning T., Böttcher A., Kahl G., Schmitz G. (1990), Macrophage interaction of HDL subclasses separated by free flow isotachopheresis, *J. Lipid. Res.* **31**: 1947-1963
- Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E., Lisanti M.P. (1998), Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**:5419-5422
- Olivo C., Vanni C., Mancini P., Silengo L., Torrisi M.R., Tarone G., Defilippi P., Eva A. (2000), Distinct involvement of CDC42 and RhoA GTPases in actin organisation and cell shape in untransformed and Dbl oncogene transformed NIH3T3 cells, *Oncogene* **19(11)**: 1428-36
- Olson M.F., Ashworth A., Hall A. (1995), An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1, *Science* **269**: 270-1272
- Oram J.F. (1990), Cholesterol trafficking in cells, *Curr. Opin. Lipidol.* **1**: 416-421
- Oram J.F. and Yokoyama S. (1996), Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids, *J. Lipid. Res.* **37**: 2473-2491
- Ordovas J.M. (2000), ABC1: the gen for Tangier disease and beyond, *Nutr Rev* **58(3Pt1)**: 76-79
- Orsó E., Broccardo C., Kaminski W.E., Böttcher A., Liebisch G., Drobnik W., Götz A., Chambenoit O., Diederich W., Langmann T., Spruss T., Luciani M.-F., Rothe G., Lackner K.J., Chimini G., Schmitz G., Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and *Abc1* deficient mice. *Nat Genet* 2000 **24**:192-196
- Pajkrt D., Doran J.E., Koster F., Lerch P.G., Arnet B., van der Poll T., ten Cate J.W., van Deventer S.J. (1996), Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia, *J Exp Med* **184(5)**: 1601-8
- Pappu A.S. and Hauser G. (1983), Propanolol-induced inhibition of rat brain cytoplasmic phosphatidate phosphohydrolase, *Neurochem. Res.* **8**: 1656-1575
- Parish C.A. and Rando R.R. (1996), Isoprenylation/methylation of proteins enhances membran association by a hydrophobic mechanism, *Biochemistry* **35(26)**: 8473-8477
- Parker T.S., Levine D.M., Chang J.C., Laxer J., Coffin C.C., Rubin A.L. (1995), Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood, *Infect Immun* **63(1)**: 253-258
- Parsons J.T. (1996), Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 146-152
- Parton R.G. (1996), Caveolae and Caveolins, *Curr Opin Cell Biol* **8**: 542-548
- Parton R.G. and Simons K. (1995), Digging into Caveolae, *Nature* **269**: 1398-1400

- Pentchev P.G., Comly M.E., Kruth H.S., Vanier M.T., Wenger D.A., Patel S., Brady R.O. (1985), A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8247-8251
- Peppelenbosch M., Boone E., Jones G.E., et al (1999), Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J.Immunol.*; **162**: 837-845
- Pieters M.N., Schouten D., Van Berkel T.J.C. (1994), In vitro and in vivo evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport, *Biochim. Biophys. Acta* **1225**: 125-134
- Price L.S., Leng J., Schwartz M.A., Bokoch G.M. (1998), Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading, *Mol.Biol.Cell* **9**: 1863-1871
- Pritchard P.H., McLeod R.M., Frohlich J., Parh M.C., Kudchodkar B.J., Lacko A.G. (1988), Lecitin-cholesterol acyltransferase metabolism in familial HDL deficiency (Tangier disease) *Biochim Biophys Acta* **958**: 277
- Quinn T. (1998), Does Chlamydia pneumoniae cause coronary heart disease?, *Curr. Opin Infect Dis* **11**: 301-307
- Razani B., Rubin C.S., Lisanti M.P., Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* 1999 **274**:26353-26360
- Remaley A.T., Rust S., Rosier M., Knapper C., Naudin L., Broccardo C., Peterson K.M., Koch C., Arnould I., Prades C., Duverger N., Funke H., Assmann G., Dinger M., Dean M., Chimini G., Santamarina-Fojo S., Fredrickson D.S., Deneffe P., Brewer H.B. Jr. (1999), Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12685-1269028
- Remaley A.T., Schumacher U.K., Stonik J.A., Farsi B.D., Nazih H., Brewer H.B.J. (1997), Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux, *ATVB* **17**: 1813-1821
- Robenek H. and Schmitz G. (1991), Abnormal processing of golgi elements and lysosomen in Tangier disease, *Arteriosklerosis Thromb* **11**: 1007-1020
- Rogler G., Trümbach B., Klima B., Lackner K.J., Schmitz G.(1995), HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients, *ATVB* **15**: 683-690
- Ross R. (1986), The pathogenesis of atherosclerosis: an update, *New Engl. J. Med.* **314**: 488-500
- Ross R. (1999), Atherosclerosis-an inflammatory disease *N. Engl. J. Med.* **340**: 115-126
- Ross R. and Glomset J.A.(1976), The pathogenesis of atherosclerosis, *New Engl. J. Med.* **295**: 369-377; 420-425
- Ross R.(1993), The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* **362**: 801-809
- Ross R.(1995), Cell biology of atherosclerosis, *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 791-804
- Rothblat, G.H., de la Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D.L., and Phillips, M.C. (1999), Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights: *J Lipid Res*, **40**, 781-796

Roy S., Luetterforst R., Harding A., Apolloni A., Etheridge M., Stang E., Rolls B., Hancock J.F., Parton R.G., Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1999 **1**:98-105

Rubba P. and Mancini M.(1995), Lipid-lowering treatment: effects on endothelial dysfunction, *Curr Opin Lipidol* **6(6)**: 348-53

Rust S., Rosier M., Funke H., Real J., Amoura Z., Piette J.C., Deleuze J.F., Brewer H.B., Duverger N., Deneffe P., Assmann G., (1999), Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, **22**:352-355

Rust S., Walter M., Funke H., von Eckardstein A., Cullen P., Kroes H.Y., Hordijk R., Geisel J., Kastelein J., Molhuizen H.O., Schreiner M., Mischke A., Hahmann H.W., Assmann G. (1998), Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. *Nat Genet* 1998 **20**:96-98

Sato Y. and Rifkin D.B. (1989), Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming growth factor- β 1-molecule by plasmin during co-culture, *J. Cell. Bio.* **109**: 309-315

Schaefer E.J., Rader D.J., Gregg R.E. et al. (1990), In vivo apo B-100 and apo A-I kinetics in Tangier disease utilizing a stable isotope technique, *Circulation* **82(III)**: 447

Schmid S.L. (1997), Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process, *Annu Rev Biochem* **66**: 511-548

Schmitz G., Robenek U., Lohmann G., Assmann G.(1985), Interaction of high density lipoproteins with cholesterol-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages, *EMBO J.* **4**: 613-622

Schmitz G., Assmann G., Brennhausen B., Schaefer H.J. (1987), Interaction of Tangier lipoproteins with cholesteryl ester-laden mouse peritoneal macrophages, *J. Lipid. Res.* **28**: 87-99

Schmitz G., Assmann G., Robenek H., Brennhausen B., (1985b), Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6305-6309

Schmitz G., Beuck M., Fischer H., Nowicka G., Robenek H. (1990), Regulation of phospholipid biosynthesis during cholesterol influx and high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages, *J. Lipid. Res.* **31**: 1741-1752

Schmitz G., Fischer H., Beuck M., Hoecker K.P., Robenek H. (1990), Dysregulation of lipid metabolism in Tangier monocyte-derived macrophages, *Arteriosclerosis* **10**: 1010-1019

Schmitz G., Kaminski W.E., Prsch-Özcürümez M., Klucken J., Orso E., Bodzioch M., Büchler C., Drobnik W. (1999), ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in macrophages: a dual function in inflammation and lipid metabolism?, *Pathobiology* **67(5-6)**: 236-240

Schmitz G., Lackner K.J. (1993), High-density lipoproteins and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* **4**: 392-400

Schmitz G., Müller G. (1991), Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids, *J. Lipid. Res.* **32**: 1539-1570

Schmitz G., Orso E., Rothe G., Klucken J. (1997), Scavenging, signalling and adhesion coupling in macrophages: implications for atherogenesis, *Curr. Opin. Lipidol.* **8**: 287

- Schmitz G., Rogler G., Drobnik W., Trümbach B., Moellers C., Lackner K.J. (1995), The defective in HDL3 mediated efflux of newly synthesized cholesterol is associated with impaired activation of protein kinase c in Tangier fibroblasts, *Cardiovascular Disease* **2**: 79-87
- Schnitzer J.E., Liu J., Oh P. (1995), Endothelial Caveolae have the molecular Transport Machinery for Vesicle Budding, Docking, and Fusion Including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases, *J Biol Chem* **270(24)**: 14399-14404
- Schuler G.D., Boguski M.S., Stewart E.A., Stein L.D., Gyapay G., Rice K., White R.E., Rodriguez-Tome P. et al. (1996), A gene map of the human genome, *Science* **274**: 540-546
- Schwenke D.C., St Clair R.W. (1993), Influx, efflux, and accumulation of LDL in normal arterial areas and atherosclerotic lesions of white Carneau pigeons with naturally occurring and cholesterol-aggravated aortic atherosclerosis, *Arterioscler Thromb* **13**:1368-1381.
- Shaklady M.M., Djardjouras E.M., Lloyd J.K. (1968), Red-cell lipids in familial alpha-lipoprotein deficiency (Tangier disease), *Lancet* **2**: 151-153
- Shinjo K., Koland J.G., Hart M.J., Narasimhan V., Johnson D.I., Evans T., Cerione R.A. et al. (1990), Molecular Cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein G(p) (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **87**: 9853-57
- Simionescu N., Vasile E., Mora R. et al. (1990), Prelesional modification of the vessel wall in hyperlipidemic atherogenesis. Extracellular accumulation of modified and reassembled lipoproteins, *Ann. NY. Acad. Sci.* **598**: 1-16
- Singer W.D., Brown H.A., Bokoch G.M., Sternweis P.C. (1995), Resolved phospholipase D activity is modulated by cytosolic factors other than Arf, *J.Biol.Chem.* **270**: 14944-14950
- Smart E.J., Ying Y.S., Conrad P.A., Anderson R.G.W. (1994), Caveolin moves from Caveolae to the Golgi Apparatus to the Golgi in Response to Cholesterol Oxidation, *J Cell Biol* **127(5)**: 1185-1197
- Smith a.J., Timmersmans-Hereijgers J.L., Roelofsen B., Wirtz K.W., van Blitterswijk W.J., Smit J.J., Schinkel A.H., Borst P. (1994), The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasmamembran of fibroblasts from transgenic mice, *FEBS Letters* **354**: 263-266
- Steinberg D. (1991), Lipoprotein modification and atherogenesis, *Atheroscler. Rev.* **23**: 115-121
- Steinberg D., Lewis A. (1997), Oxidative modification of LDL and atherogenesis, *Circulation* **95**: 1062
- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. et al. (1989): Modification of LDL that increase atherogenicity, *N. Engl. J. Med.* **320**: 915-924
- Steinberg D., Witztum J.L. (2002), Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* **105**:2107-2111.
- Stöhr J., Schindler G., Rothe G., Schmitz G. (1998), Enhanced upregulation of the Fcγ Receptor IIIa (CD16a) during in vitro differentiation of apoE4/4 monocytes, *ATVB* **18**: 1424-1432
- Sun H.Q., Kwiatkowska K., Yin H.L. (1995); *Curr Opin Cell Biol* **7**: 102-110

- Symons M. (1996), Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond, *Trends.Biochem.Sci.* **21**: 178-181
- Tabas I. (1999), Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis, *Annu. Rev. Nutr.* **19**:123
- Tabas I., Li Y., Brocia R.W. et al. (1993) Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* **268**:20419-20432.
- Tailleux A. and Fruchart J.C. (1996), HDL heterogeneity and atherosclerosis; *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **33(3)**: 163-201
- Takai Y., Sasaki T., Tanaka K., Nakanishi H. (1995), Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends.Biochem.Sci.* **20**: 227-231
- Tall A.R.(1990), Plasma high density lipoprotein. Metabolism and relationship to atherosclerosis, *J. Clinic. Invest.* **61**: 270-277
- Tanaka K. and Takai Y. (1998), Control of reorganisation of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast, *Curr Opin Cell Biol* **10**: 112-116
- Terkelstaub R., Banka C.L., Solan J., Santaro D., Brand K., Curtiss L.K. (1994), Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte activity, *Arterioscler. Thromb.* **14**: 47-53
- Theilmeier G., De Geest B., Van Veldhoven P.P., Stengel D., Michiels C., Lox M., Landeloos M., Chapman M.J., Ninio E., Collen D., Himpens B., Holvoet P. (2000), HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice, *FASEB* **14(13)**: 2032-9
- Timothy M., Harlan J.M., Haraln C. (1994), Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules, *Blood* **84(7)**: 2068-2101
- Torzewski J, Bowyer D.E., Waltenberger J, Fitzsimmons C. (1997), Process in atherogenesis: complement activation, *Athersclerosis* **132**: 131
- Torzewski J., Torzewski M., Bowyer D.E. et al. (1998), C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerosis lesions of human coronary arteries, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 1386-1392, a
- Torzewski M., Klouche M., Hock J., Messner M., Dorweiler B., Torzewski j. Gabbert H.E. Bhakdi S. (1998), Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and ist colocalisation with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**: 369, b
- Trümbach B. (1997), Untersuchungen zum High Density Lipoprotein-vermittelten Efflux von Lipiden in Morbus Tangier, *Dissertation Universität Regensburg*
- Ueda K., Taguchi Y., Morishima M.(1997), How does P-glycoprotein recognize its substrates?, *Semin. Cancer. Biol.* **8**: 151-159
- Vadas M.A., Gamble J.R., Rye K., Barter P. (1997), Regulation of Leukocyte-Endothelial Interaction of Special Relevance to Atherogenesis, *Clin Exp Pharm Physiol* **24**: A33-35
- van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE (1992) Macrophage differentiation in atherosclerosis: an in situ immunohistochemical analysis in humans. *Am J Pathol* **141**: 161-168

- van Helvoort A., Smith A.J., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel A.H., Borst P., van Meer G. (1996), MDR-1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocate phosphatidylcholine, *Cell* **87**: 507-517
- van Veen H.W. and Konings W.N. (1997), Multi drug transporter from bacteria to man: similarities in structure and function, *Semin. Cancer. Biol.* **8**: 183-191
- Vance D.E. and Vance J., (1996), Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (Vance D.E. and Vance J. eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- Veniant M.M., Zlot C.H., Walzem R.L., Pierotti V., Criscoll R., Dichek D., Herz J., Young S.G., (1998), Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient „Apo-B48-only and Apo-B100-only“ mice, *J. Clin. Invest.* **102**: 1559-1568
- Vijayagopal P., Srinivasan S.R., Radhakrishnamurthy B, Berensen G.S. (1993), Human monocyte-derived macrophages bind low-density-lipoprotein-proteoglycan complexes by a receptor different from the low-density-lipoprotein receptor, *Biochem. J.* **289** (pt3): 837
- Vlassara H., Fuh H. Donnelly T., Cybulsky M. (1995), Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule expression and atheroma formation in normal rabbits, *Mol. Med.* **1**: 447-456
- von Eckardstein A., Chirazi A., Schuler-Luttman S., Walter M., Kastelein J.J., Geisel J., Real J.T., Miccoli R., Nosedà G., Hobbel G., Assmann G. (1998), Plasma and fibroblasts of Tangier disease patients are disturbed in transferring phospholipids onto apolipoprotein A-I, *J. Lipid. Res.* **39**: 987-998
- Walter M., Reinecke H., Nofer J.R., Seedorf U., Assmann G. (1996), Defective regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in a kindred with Tangier disease. Evidence for the involvement of phosphatidylcholine breakdown in HDL-mediated cholesterol efflux mechanisms, *J. Clin. Invest.* **98**: 2315-2323
- Walter S.J., Wu W.J., Cerione R.A., Brown H.A. (2000), Activation of Phospholipase D1 by CDC42 requires the Rho-Insert Region, *J Biol Chem* **275(21)**: 15665-668
- Wang C.S., Alaupovic P., Gregg R.E., Brewer H.B. (1987), Studies on the mechanism of hypertriglyceridemia in Tangier disease, *Biochim Biophys Acta* **920**: 9
- Webb S.E., Pollard J.W. and Jones G.E., (1996), Direct observation and quantification of macrophage chemoattraction to the growth factor CSF-1, *J Cell Sci*, **109 (Pt 4)**, 793-803
- Weber C., Draude G., Weber K.S., Wubert J., Lorenz R.L., Weber P.C. (1999), Downregulation by TNF alpha of CCR2-Expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxLDL: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions, *Atherosclerosis* **145(1)**: 115-23
- Weber K.S.C., Klickstein L.B., Weber P.C., Weber C. (1998), Chemokine-induced monocyte transmigration requires CDC42-mediated cytoskeletal changes, *Eur.J.Immunol.* **28**: 2245-2251
- Wirtz K.W.A. (1997), Phospholipid transfer proteins revisited, *Biochem. J.* **324**: 353-360
- Wittinghofer A., Scheffzek K., Ahmadian M.R. (1997), The interaction of Ras with GTPase-activating proteins, *FEBS Letters* **410(1)**, 63-67
- Witztum J.L., Steinberg D. (2001), The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* **11**:93-102.

- Wu W.J., Erickson J.W., Lin R., Cerione R.A. (2000), The γ -subunit of the coatamer complex binds CDC42 to mediate transformation, *Nature* **405**: 800-804
- Xia P., Vadas M.A., Rye K.A., Barter P.J., Gamble J.R. (1999), High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway: possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL, *J Biol Chem.* **274(46)**: 33143-7
- Yamamoto M., Toya Y., Schwencke C., Lisanti M.P., Myers M.G. Jr, Ishikawa Y., Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 1998 **273**:26962-26968
- Zech L.S., Schaefer E.J., Bronzert T.J. et al. (1983), Metabolism of human apolipoproteins A-I and A-II, *J.Lipid.Res.* **24**: 60-71
- Zhang B. and Zheng Y. (1998), Negative regulation of CDC42/Rac by homodimer-formation, *J Biol Chem* **273**: 25728-733
- Zigmond S.H. (1996), Signal transduction and actin filament organization. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**: 66-73

b) Diskussion

- Badalato R., Sozzani S., Malacarne F., Bresciani S., Fiorini M., Borsatti A., Albertini A., Mantovani A., Ugazio A.G., Notarangelo L.D. (1998), Monocytes from Wiskott-Aldrich Patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarisation in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, *J. Immunol* **161**: 1026-1033
- Banyard J., Anand-Apte B., Symons M., Zetter B.R. (2000), Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases, *Oncogene* **19**: 580-591
- Binks M., Jones G.E., Brickell P.M., Kinnon C., Katz D.R., Thrasher A.J. (1998), Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome, *Eur. J. Immunol.* **28**: 3259-3267
- Bretscher A. (1999), Regulation of cortical structure by the ERM-protein family, *Curr Opin Cell Biol* **11**:109-116
- Calvo D., Gomez-Coronado D., Lasuncion M.A., Vega M.A. (1997), CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, VLDL) and modified (OxLDL, AcLDL) lipoproteins, *ATVB* **17**: 2341-2349
- Clinton S.K., Underwood R., Hayes L., Sherman M.L., Kufe D.W., Libby P. (1992), Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis, *Am J Pathol* **140**: 301-316
- De Villiers W.J., Smith J.D., Miyata M., Dansky H.M., Darley H.M., Gordon S. (1998), Macrophage phenotype in mice deficient in both macrophage-colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E, *ATVB* **18(4)**: 631-40
- Eisenmann K.M., McCarthy J.B., Simpson M.A., Keely P.J., Guan J.L. Tachibana K., Lim L., Manser E., Furcht L.T., Lida J. (1999), Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through CDC42, ACK-1 and p130cas, *Nat. Cell. Biol.* **1**: 507-513
- Green J.M., Zhelesnyak A., Chung J., Lindberg F.P., Sarfati M., Frazier W.A., Brown E.J. (1999), Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving α 5 β 3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins, *J Cell Biol* **146**: 673-82

- Guinamard R., Aspenström P., Fougereau M., Chavrier P., Guillemot J.C. (1998), Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrom protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42, *FEBS* **434**: 431-436
- Guo M. and Hay B.A. (1999), Cell proliferation and apoptosis, *Curr Opin Cell Biol* **11**: 745-752
- Hamilton J.A. (1997), CSF-1 signal transduction, *J Leukoc Biol* **62(2)**: 145-55
- Hashimoto S., Suzuki T., Dong H., Yamazaki N., Matsushima K. (1999), Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages, *Blood* **94(3)**: 837-844
- Hogger P., Dreier J., Droste A., Buck F., Sorg C. (1998), Identification of the integral membran protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich-family (CD163), *J Immunol* **161**: 1883-1890
- Horwitz A.R. and Parson J.T. (1999), Cell migration-movin`on, *Science* **286**: 1102-3
- Imamura K., Dianoux A., Nakamura T., Kufe D. (1990), Colony-stimulating factor 1 activates protein kinase C in human monocytes, *EMBO J* **9(8)**: 2423-8
- Jaworowski A., Wilson N.J., Christy E., Byrne R., Hamilton J.A. (1999), Roles of the mitogen-activated protein kinase family in macrophage response to colony stimulating factor-1 addition and withdrawal, *J Biol Chem* **274(21)**: 15127-33
- Kaibuchi K., Kuroda S., Fukata M., Nakagawa M. (1999), Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases, *Curr Opinion Cell Biol* **11**: 591-596
- Kapinsky M., Torzewski M., Büchler C., Duong C.Q., Rothe G., Schmitz G. (2001), Monocyte differentiation and foam cell formation induced by hydrolase modified lipoproteins, Monocyte heterogeneity, scavenger receptor expression and recognition of opsonized ligands, *ATVB*, accepted
- Keely P.J., Westwick J.K., Whitehead I.P., Der C.J., Parise L.V. (1997), CDc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K, *Nature* **390**: 632-636
- Kuroda S., Fukata M., Nakagawa M., Fujii K., Nakamura T., Ookubo T., Izawa I., Nagase T., Nobuo T., Tani H., Shoji I., Matsuura Y., Yonehara S., Kaibuchi K. (1999), Role of IQGAP, a target of the small GTPases CDC42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion, *Science* **281**: 832-835
- Kuroda S., Fukata M., Nakagawa M., Kaibuchi K. (1998), CDC42, RAC1 and their effector IQGAP as molecular switch for cadherin-mediated cell-cell adhesion, *BBRC* **262**: 1-6
- Lauffenberger D.A. and Horwitz A.R. (1996), Cell migration: a physically integrated molecular process, *Cell* **84**: 359-369
- Li S., Wang Q., Chakladar A., Bronson R.T., Bernards A. (2000), Gastric hyperplasia in mice lacking the putative CDC42 Effector IQGAP1, *Mol Cell Biol* **20(2)**: 697-701
- Hirao M., Sato N., Kondo T., Yonemura S., Monden M., Sasaki T., Takai Y., Tsukita S., Tsukita S. (1996), Regulation Mechanism of ERM Protein/Plasma Membrane Association: Possible Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-dependent Signaling Pathway, *J Cell Biol* **135(1)**: 37-51
- Mackay D.J.G.; Esch F., Furthmayr H., Hall H. (1997), Rho- and Rac-dependent Assembly of Focal Adhesion Complexes and Actin Filament in Permeabilized Fibroblasts: An Essential Role for Ezrin/Radixin/Moesin Proteins, *J Cell Biol* **138(4)**: 927-938,

- Marshall C. (1999), How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry?, *Curr Opin Cell Biol* **11**: 732-736;
- Michiels F. and Collard E.E (1999), Rho-like GTPases: their role in adhesion and invasion, *Biochem Soc Symp* **65**: 125-46
- Miki H., Sasaki T., Takai Y., Takenawa T. (1998), Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP, *Nature* **391**: 93-96
- Morganelli P.M., Rogers R.A., Kitzmiller T.J., Bergeron A. (1995), Enhanced metabolism of LDL aggregates mediated by specific human monocyte IgG FC receptors, *J Lipid Res* **36**: 714-724
- Mullins R.D. (2000), How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures, *Curr Opin Cell Biol* **12**: 91-96
- Nakamura N., Oshiro N., Fukata Y., Amano M., Fukata M., Kuroda S., Matsuura Y., Leung T., Lim L., Kaibuchi K. (2000), Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by CDC42, *Genes to Cells* **5**: 571-581
- Olson M.F., Ashworth A., Hall A. (1995), An essential role for Rho, Rac and CDC42 GTPases in Cell Cycle Progression through G1, *Science* **269**: 1270-1273
- Qiao J.H., Tripathi J., Mishra N.K., Cai Y., Tripathi S., Wang X.P., Imes S., Fishbein M.C., Clinton S.K., Libby P., Lusis A.J., Rajavashisth T.B. (1997), Role of macrophage colony-stimulating factor in atherogenesis: studies of osteopetrotic mice, *Am J Pathol* **150(5)**: 1687-99
- Rothe G., Gabriel H., Kovacs E., Klucken J., Stöhr J., Kindermann W., Schmitz G. (1996), Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia, *ATVB* **16**: 1437-1447
- Sanchez-Madrid F. and del Pozo M.A. (1999), Leukocyte polarisation in cell migration and immune interaction, *EMBO Journal* **18(3)**: 501-511
- Sander E.E. and Collard J.G. (1999), Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion, *Eur J Cancer* **35(9)**: 1302-8
- Sandig M., Korvemaker M.L., Ionescu C.V., Negrou E., Rogers K.A. (1999), Transendothelial migration of monocytes in rat aorta: distribution of alpha-catenin, LFA-1, and PECAM-1, *Biotech Histochem* **74(6)**: 276-93
- Sandig M., Negrou E., Rogers K.A. (1997), Changes in the distribution of LFA-1, catenins, and F-actin during transendothelial migration of monocytes in culture, *J Cell Science* **110**: 2807-2818
- Sato N., Funayama N., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. (1992), A gene family consisting of ezrin, moesin and radixin. Its specific location at actin filament/plasma membrane association sites. *J. Cell. Sci* **103**: 131-143
- Stella H.K., Li Z., Sacks D.B. (2000), E-Cadherin-mediated cell-cell attachment activates CDC42, *JBC* accepted
- Stowers L., Yelon D., Berg L.J., Chant J. (1995), Regulation of the polarisation of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42, *PNAS* **92**: 5027-5031
- Symons M., Derry J.M.J., Karlak B., Jiang S., Lemahieu V., McCormick F., Francke U., Abo A. (1996), Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerisation, *Cell* **84**: 723-734

Tsukamoto, K., K. Hirano, K. Tsujii, C. Ikegami, Z. Zhongyan, Y. Nishida, T. Ohama, F. Matsuura, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa. (2001), ATP-binding cassette transporter-1 induces rearrangement of actin cytoskeletons possibly through Cdc42/N-WASP. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **287**: 757-765

Tsukita S. and Yonemura S. (1999), Cortical actin organisation: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins, *J. Biol. Chem* **274**: 34507-34510

Yeung Y.G., Wang Y., Einstein D.B., Lee P.S., Stanley E.R. (1998), Colony-stimulating factor-1 stimulates the formation of multimeric cytosolic complexes of signaling proteins and cytoskeletal components in macrophages, *J Biol Chem* **273(27)**: 17128-37

Yoshida H., Tomiyama Y., Ishikawa J., Oritani K., Matsumura I., Shiraga M., Yokota T., Okajima Y., Ogawa M., Miyagawa J., Nishiura T., Matsuzawa Y. (2000), Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell through CDC42, *Blood* **96**: 234-41

Zicha D., Allen W.E., Brickell P.M., Kinnon C., Dunn G.A., Jones G.E., Thrasher A.J. (1998), Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrom, *J. Haematol* **101**: 659-663

8. Originalpublikationen

1. **Diederich W**, Orsó E, Drobnik W and Schmitz G. Apolipoprotein AI and HDL₃ inhibit spreading of primary human monocytes through a mechanism that involves cholesterol depletion and regulation of CDC42. *Atherosclerosis*, 159:313-24, 2001
2. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, **Diederich W**, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 22, 347-51, 1999
3. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Böttcher A, Liebisch G, Drobnik W, Götz A, Chambenoit O, **Diederich W**, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G. Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet*, 24:192-6, 2000
4. Kaminski WE, Orso E, **Diederich W**, Klucken J, Drobnik W, Schmitz G. Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). *Biochem Biophys Res Commun*, 273:532-8, 2000
5. Klucken J, Büchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, **Diederich W**, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:817-22, 2000

9. Abkürzungen

ABCA1	ATP binding cassette transporter 1
ACAT	Acyl-Coenzym A:Cholesterinacyltransferase
Apo	Apolipoprotein
BIP	Bezafibrate Infarction Prevention Study
CETP	Cholesterinestertransferprotein
CDC42	Cell-Division-Cycle-Protein
COX-2	Zyklooxygenase 2
1,2-DAG	1,2-Diacylglycerol
E-LDL	Enzymatisch modifiziertes LDL
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HDF	High Density Fraktion
HDL	High Density Lipoproteine
HL	Hepatische Lipase
IP3	Inositol-3-Phosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low Density Lipoproteine
LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterin
LPL	Lipoproteinlipase
LRCF	Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow-up Study
LRCPPT	Lipid Research Clinics Coronary Prevention Trail
LDF	Low Density Fraktion
M-CSF	Monocyte colony stimulating factor
NCEH	Neutrale Cholesterinesterhydrolase
NO	Stickstoffmonoxid
Ox-LDL	Oxidiertes LDL
PC-PLC	Phosphatidylcholin spezifische Phospholipase C
PI-PLC	Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
PLTP	Phospholipidtransferprotein
RES	Retikuloendotheliales System
SR-BI	Scavenger receptor BI
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. med. Wolfgang Drobnik als Betreuer meiner Doktorarbeit

Prof. Dr. Gerd Schmitz

Direktor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Universität Regensburg

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe

Michael Kapinsky (als Freund und Kollege)

Jolanthe Aiwanger

Gerhard Liebisch

Bernd Lieser

Stefan Barlage

Alfred Böttcher

Evelyn Orso

Wolfgang Kaminski

Mirko Ritter

Und vielen anderen mehr

Förderung

Die durchgeführten Experimente wurden durch folgende Förderprojekte unterstützt:

Sachbeihilfe der DFG, DR 348/2-1

Sachbeihilfe der DFG, DR 348/2-2